

**Zum Stoffwechsel
von OPIPRAMOL (Insidon^R)
beim Menschen**

von

Ruth Märsch

aus

Habendorf Krs. Reichenbach/Schles.

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

**Zum Stoffwechsel
von OPIPRAMOL (Insidon^R)
beim Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Ruth Märsch
aus
Habendorf Krs. Reichenbach/Schles.

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof.Dr. E.Wetterer
Correferent: Prof.Dr.Dr. E.Weinig
Referent: Priv.Doiz.Dr.Dr. M.Geldmacher-
v. Mallinckrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.7.1968

Inhaltsverzeichnis

=====

	Seite
I. Therapeutische Anwendung und Nebenwirkungen	1
II. Pharmakologische Eigenschaften	4
III. Vergiftungen mit Opipramol	5
IV. Chemische Eigenschaften	6
V. Qualitativer Nachweis	8
VI. Stoffwechsel beim Warmblüter	13
VII. Stoffwechseluntersuchungen beim Menschen	15
VIII. Iminostilben als Stoffwechselprodukt des Opipramol	
1.) Chemische Eigenschaften	18
2.) Qualitativer Nachweis	19
IX. Eigene Beobachtungen	
1.) Vorgeschichte und klinischer Befund	34
2.) Klinischer Verlauf	35
3.) Chemische Untersuchungen	36
a) Mageninhalt	
a ₁) saurer Extrakt	38
a ₂) alkalischer Extrakt	38
a ₃) neutraler Extrakt	41
b) Urin	
b ₁) saurer Extrakt	45
b ₂) alkalischer Extrakt	48
b ₃) neutraler Extrakt	53
4.) Physikalische Untersuchungen	
a) Schmelzpunktbestimmung	66
b) Kristallstrukturelle Untersuchungen	67
5.) IR-spektrophotometrische Untersuchungen	
a) Insidonfraktion	68
b) Metabolit I	69
X. Diskussion	71
XI. Zusammenfassung	79
XII. Literaturnachweis	81

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zum Stoffwechsel von OPIPRAMOL (Insidon^R)

beim Menschen.

I. Therapeutische Anwendung und Nebenwirkungen.

OPIPRAMOL (Insidon^R)^{X)} ist ein Thymoleptikum, das von den Pharmakologen wegen seiner im Vergleich zu anderen Thymoleptika und Neuroplegica geringen vegetativen Wirkungen übereinstimmend als tranquilisierend - thymoleptische Substanz beschrieben wird (Schmid 1965).

Nach Kuhn (1961) Donzallaz (1961) und Pichler (1962) besteht eine Wirkungsverwandtschaft sowohl zu Imipramin (Tofranil^R) als auch zu Chlorpromazin. Pöldinger (1962) hat folgendes Schema über die Zuordnung des Insidons aufgestellt:

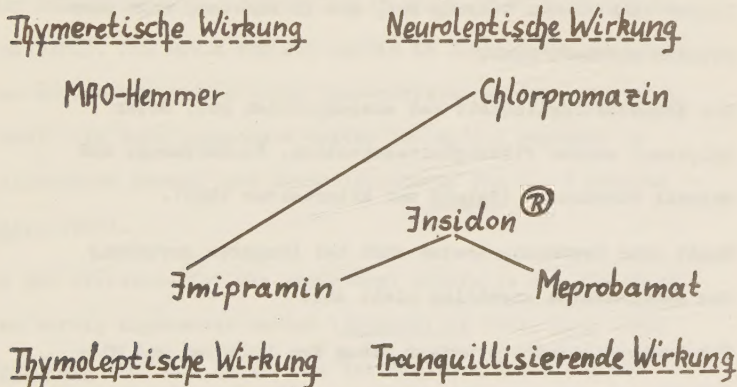


Abb. 1: Vereinfachtes Schema nach Pöldinger

X)

Hersteller: J.R. Geigy, Basel; Vertrieb: Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss
(Versuchsbezeichnung G 33 040)

Während Imipramin als "großes Thymoleptikum" in erster Linie vom Psychiater und in Anstalten eingesetzt wird, hat sich Opipramol als "kleines Thymoleptikum" infolge seiner Breitenwirkung, guten Verträglichkeit (auch bei Langzeittherapie) und seiner geringen und unbedeutenden Nebenwirkungen in der allgemeinen Praxis und zur ambulanten Behandlung bewährt (Junkenitz und Schäfer 1964).

Die unter therapeutischer Dosierung evtl. auftretenden Nebenwirkungen bestehen im wesentlichen aus vorübergehender Müdigkeit, geringem Schwindelgefühl, Mundtrockenheit und gelegentlichen Schweißausbrüchen im Beginn der Behandlung. Vor Alkoholgenuß während der Insidoneinnahme wird allerdings gewarnt (Lindner 1964, Kunkel 1963). Nach Braunhofer (1962) tritt schon bei kleinen Alkoholmengen ein starker Potenzierungseffekt in Gestalt einer erheblichen ataktischen Störung auf, die 20 Minuten, aber auch Stunden andauern kann.

Die Magenverträglichkeit ist ausgesprochen gut. Unter Opipramol werden Flüssigkeitssekretion, Fermentmenge und Motorik vermindert (Schmid und Mitarbeiter 1965).

Sucht oder Gewöhnung treten auch bei längerer Anwendung des Medikamentes angeblich nicht auf.

Das Indikationsgebiet umfaßt neben den leichten und mittelschweren endogenen Depressionen in der Psychiatrie in der allgemeinen Praxis vor allen Dingen Symptome des Überforderungssyndroms mit seinen mehr oder weniger im Vordergrund stehenden Organbeschwerden. (Donzallaz 1961, Azima

und Mitarbeiter 1962, Braunhofer 1962, Daxelmüller 1962, Düggelin 1962, Hirsch und Holtapfel 1962, Höfeld 1962, Holtz 1962, 1964, Junkenitz 1962, Pichler 1962, Pöldinger 1962, Racamier 1962, Schäfer 1962, Schmitt und Mitarbeiter 1962, Chapel 1963, Del Mastro 1963, Konietzko 1963, Kunkel 1963, Lissandrello 1963, Montserratt und Mitarbeiter 1963, Gubitz 1964, Junkenitz und Schäfer 1964, Lindner 1964, Grosser und Ryan 1965, Laubichler 1965, Lohmüller 1965, Reiter 1965, Schmid und Mitarbeiter 1965, Venecovsky und Mitarbeiter 1965, Alapin und Mitarbeiter 1966, Alvarez Sánchez 1966, Bojanovsky und Mitarbeiter 1966, Chulés Orti und Mitarbeiter 1966, Hammerl und Pichler 1966, Johnson 1966, Kaltwasser 1966, Kubo 1966, Livingstone 1966, Murad 1966, Privat 1966, Rajotte und Mitarbeiter 1966, Simpson und Mitarbeiter 1966, Tetreault und Mitarbeiter 1966, Tietzen 1966).

Daneben hat Insidon auch in der gynäkologischen Praxis Eingang gefunden, insbesondere bei der Behandlung des vegetativ-dysphorischen Syndroms im Klimakterium (Dietsch 1962, 1964, 1965, Hartel 1963, Kleibel 1964, Artner 1966, Antônio 1966).

Insidon kann peroral und parenteral verabreicht werden. Die optimale Dosierung beträgt bei peroraler Anwendung im Beginn der Behandlung 150 - 200 mg/die (1 Dragée = 50 mg der Wirksubstanz). Die Dosis von 200 mg/die in Einzelgaben sollte in der ambulanten Praxis nicht überschritten werden (Junkenitz 1962). Als Erhaltungsdosis werden 100 mg/die gegeben; im allgemeinen genügt eine Behandlungsdauer von 2 - 3 Monaten (Holtz 1962).

In der Pädiatrie ist das Medikament ebenfalls mit gleich gutem Erfolg angewendet worden (Daxelmüller 1962, Kuhn 1963, Krakowski 1965 und 1966). Die verträgliche Dosierung bei zufriedenstellenden Erfolgen beträgt 100 mg bei einem Körpergewicht von ca. 30 kg (Boucaud und Kerneuzet 1963). Doch hat Schmöger vor kurzem die Möglichkeit einer Intoxikation bei

Kindern aufgezeigt, ohne daß eine Überdosierung vorliegen muß, und zwar aufgrund der geringen Verträglichkeit von bestimmten Psychopharmaka in diesem Alter (Hohenauer 1966).

II. Pharmakologische Eigenschaften.

=====

Während über die therapeutischen Erfahrungen und die Anwendbarkeit des Insidons zahlreiche Berichte vorliegen, sind über die Pharmakologie und Toxikologie nur vereinzel-

te Mitteilungen vorhanden (Schmitt und Mitarbeiter 1962, Del Mastro 1963, Bichel und Brodie 1964, Gadret und Bregere 1964, Locker und Mitarbeiter 1964, 1966, Theobald und Mitarbeiter 1964, 1965, Schmid und Mitarbeiter 1965, Bojanovsky und Mitarbeiter 1966, Hammerl und Pichler 1966, Hernandez-Peon und Naranjo 1966, Hohenauer 1966).

Nach Dureux, Duprez und Kissel (1964) wirken bei Ratten wiederholt verabreichte Dosen von 111 mg/kg toxisch, führen aber nicht zum Tod der Tiere (chronische Toxizität); die LD₅₀ für Mäuse oder Ratten liegt bei intravenöser Anwendung bei 32 - 45 mg/kg, bei oraler Verabreichung bei 440 - 900 mg/kg (akute Toxizität). Weber und Laborit (1962) geben als LD₅₀ bei Ratten bei intraperitonealer Applikation 130 mg/kg und per os 900 mg/kg an. Über die chronische Toxizität berichten sie, daß Dosen von 10 mg/kg subcutan gut vertragen zu werden scheinen, während 15 mg/kg bei einer Dauer von 4 Wochen schon zu bleibenden toxischen Erscheinungen führen. Dagegen ist die Verträglichkeit bei relativ hohen oralen Dosen gut (111 mg/kg). Nach Broussolle, Drouet, Reynier und Laborit (1962) löst beim Hund eine Dosierung von 30 mg/kg i.v. eine starke Atemdepression und einen schnellen und län-

ger andauernden Blutdruckabfall aus, gefolgt von epileptischen Krisen. Dieselben Symptome geben auch Weber und Laborit (1962) bei ihren Tierversuchen an, wobei $\frac{3}{4}$ Stunden bis maximal 1 Stunde nach Beginn der Krämpfe der Tod durch Atemstillstand eintrat.

Die im Tierversuch bei toxischen Dosen auftretenden Erscheinungen decken sich größtenteils mit denen, die beim Menschen bei Intoxikationen mit Insidon beobachtet und beschrieben wurden (Frejaville und Bestel 1967).

III. Vergiftungen mit Opipramol.

=====

Wie schon vorher erwähnt, wird Insidon wegen seines breiten Anwendungsspektrums hauptsächlich zur ambulanten Behandlung verwendet. Nach Schmitt (1962) wird jede zweite depressive Psychose einer Therapie mit Insidon unterzogen, wobei viele der Patienten, die früher einer stationären Behandlung bedurften, jetzt ambulant versorgt werden können. Damit ist aber auch die Möglichkeit zu Vergiftungen mit diesem Medikament in gesteigertem Maße gegeben.

Unter den Intoxikationen sind gerade diejenigen mit Anti-depressiva - und hier wiederum in erster Linie die anticholinergisch wirkenden - besonders gefährlich und gefürchtet (Angst 1965 und 1967); es kann dabei von der Somnolenz bis zur Ausbildung eines Komas kommen, evtl. verbunden mit epileptiformen Krämpfen und anticholinergischen Symptomen.

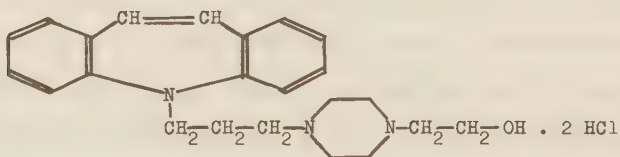
Über akute Intoxikationsfälle mit Insidon sowohl accidenteller (2 Vergiftungsfälle bei Kindern: Breton und Mitar-

beiter 1964, Hohenauer 1966) als auch suicidalen Art (Angst 1963 und 1965, Dünnet 1967, Bauer 1965 und Angst 1967) ist in der Literatur in sieben Fällen berichtet worden. Davon verliefen drei Fälle letal, wobei in einem Fall eine Dosierung von 5,0 g, im anderen Fall - bei einem Kind von 6 Jahren - eine Dosierung von 2,45 g angegeben wurde. Bei den nicht letal verlaufenen Intoxikationen betrug die Dosis 1,5 g (bei gleichzeitiger Aufnahme von Persedon), 1,2 g (bei gleichzeitiger Aufnahme von Valium), 1,5 bzw. 1,6 g und 0,8 g bei einem dreijährigen Kind. Frejaville und Bestel (1967) berichten über 17 seit Januar 1965 vorgekommene und beobachtete Intoxikationen mit Opiipramol, die trotz der aufgenommenen Dosen von 6 g und mehr nicht letal verlaufen waren.

IV. Chemische Eigenschaften.

=====

Insidon ist ein tricyclisches Dibenzazepin mit folgender Strukturformel:



5-[8 (8-Hydroxyäthylpiperazino)-propyl] -
5-H-dibenzo [b,f] azepin-dihydrochlorid

Als Iminostilbenderivat besteht einerseits eine Verwandtschaft zu den Iminodibenzolen (vgl. Tofranil) und andererseits zu Perphenazin (Decentan^R), das anstelle der CH = CH

Gruppe im Kern ein Schwefelatom trägt, während die Seitenkette mit der des Insidons übereinstimmt.

Die Seitenkette mit der Piperazingruppe bedingt den stark basischen Charakter des Insidons.

Die Substanz besteht aus goldgelben, durchsichtigen Kristallen und färbt sich unter längerer Lichteinwirkung leicht rötlich. Von Drabner (1966) wird Insidon als farblose Substanz beschrieben. Insidon ist geruchlos und schmeckt bitter. Die Löslichkeit in Wasser ist außerordentlich gut, sie nimmt ab in der Reihenfolge Chloroform, Acetonitril, Methanol, Äthanol, Äther, Aceton. Die zunächst hellgelbe Lösung in Wasser nimmt bei längerem Stehen unter Lichteinwirkung einen intensiveren gelb-orangen Farbton an.

Die in aqua dest. gelöste Insidon-Reinsubstanz ergibt einen pH-Wert von etwa 4,5.

Nach Danhier (1964) liegt die optimale Wasserlöslichkeit der Substanz bei dem sehr niedrigen pH-Wert von 1,7, nach Broussolle, Drouet, Reynier und Laborit (1962) gehen bei einem pH-Wert von 2,54 30 mg/ml der Substanz in Lösung, während bei einem pH-Wert von 3,32 nur 1 mg/ml der Substanz in Lösung gehen. Durch Bikarbonate des Natriums wird die Wasserlöslichkeit herabgesetzt und man sollte es vermeiden, einen pH-Wert von 6,0 zu überschreiten, da sich dann ein Niederschlag zeigt (Broussolle und Mitarbeiter 1962).

Der Schmelzpunkt liegt bei 212° (Schmelzbeginn bei 205°), wobei Zersetzung eintritt (Schmelzpunktbestimmung mit

Kofler Heizblock, Temperatursteigerung im Schmelzbereich ca. $3^{\circ}/\text{min.}$).

Insidon ist nicht sublimierbar. Die sich evtl. bei der Vakuumsublimation bildenden Kristalle sind Zersetzungsprodukte und haben sich nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und UV-Spektrogramm als Iminostilben erwiesen.

V. Qualitativer Nachweis.

=====

Insidon ist als Base im alkalischen Milieu mit Chloroform extrahierbar.

Die Reaktion nach CRONHEIM-WARE ist stark positiv, die Reaktionen nach FORREST dagegen erweisen sich als negativ.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung (Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) zeigt der für Insidon typische Fleck im sauren Laufmittel (Butanol, gesättigt mit 15%iger Ameisensäure nach JATZKEWITZ) einen mittleren Rf-Wert von 0,59 (0,53 bis 0,67) und im alkalischen Laufmittel (Butanol, gesättigt mit 5 N Ammoniak nach ALGERI und WALKER) einen mittleren Rf-Wert von 0,83 (0,79 bis 0,89). Mitunter können zusätzlich (evtl. bei nicht ganz frischen Lösungen) blaue Fluoreszenzen bei einem Rf-Wert von 0,29 und 0,79 im alkalischen Laufmittel und bei Rf-Werten von 0,32 und 0,75 im sauren Laufmittel auftreten, bei denen es sich wohl um Zersetzungsprodukte handelt.

Die bei der dünnstichtchromatographischen Untersuchung auf Kieselgel HF-Platten Merck in verschiedenen Laufmitteln ge-

fundenen Rf-Werte der hier wegen Fluoreszenzlöschung als Absorption erscheinenden Flecke zeigt Tab. 1:

Laufmittel	Rf-Werte
Methanol:Chloroform:conc. NH_3 (75+25+1,5) (Laufmittel A)	0,56
Methanol:Chloroform:Triäthanolamin (1:2 + 2 Tropfen) (Laufmittel B)	0,32
Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester (1:2:1) (Laufmittel C)	0,13 (0,11 bis 0,16)

Tab. 1: Rf-Werte des Insidons in verschiedenen Laufmitteln.

Auch hier können mitunter zusätzliche Flecken auftreten, und zwar bei Laufmittel A eine blaue Fluoreszenz mit einem Rf-Wert bei 0,70, im Laufmittel B eine gekoppelte Absorption und weiße Fluoreszenz bei einem Rf-Wert von 0,66 und eine Absorption bei Rf = 0,14, bei Laufmittel C eine weiße Fluoreszenz (bei entsprechend höherer Konzentration mit zusätzlicher Absorption wie vorher) bei Rf = 0,74 und eine Absorption bei einem Rf-Wert von 0,04. Es dürfte sich wieder um geringe Mengen von Zersetzungsprodukten handeln.

Insidon färbt sich mit Dragendorff's Reagenz (modifiziert nach MUNIER und MACHEBOEUF) (Merck; Reagenz Nr. 92) orange, mit HgNO_3 (Merck; Reagenz Nr. 195) und EHRLICH-Reagenz (Merck; Reagenz Nr. 69) gelb an. Diazotierte Sulfanilsäure (Merck; Reagenz Nr. 51) zeigt keine Anfärbbarkeit.

Im UV-Licht (254 nm) sieht man bei schwacher Konzentration nur eine rosa, bei stärkerer Konzentration eine gelbe

Fluoreszenz, umgeben von rosa fluoreszierenden Randbezirken.

Die UV-Absorptionskurven zeigen im sauren Milieu ($0,5 \text{ N-H}_2\text{SO}_4$) ein Maximum bei 252/253 nm. Ein häufig nur als Schulter ausgebildetes zweites Maximum liegt bei 284/286 nm. Typisch ist das Minimum bei 277/278 nm. Im alkalischen Milieu findet sich ein Maximum bei 250 nm. Bemerkenswert ist die geringe Maximumverschiebung im sauren und alkalischen Milieu. Abb. 2 zeigt die UV-Absorptionskurve der in $0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ gelösten Insidon-Reinsubstanz.

Bei Verwendung von Acetonitril oder Äthanol als Lösungsmittel liegen die Maxima bei 256/257 nm.

Die Nachweisgrenze des Insidons bei den genannten Verfahren gibt Tab. 2 wieder.

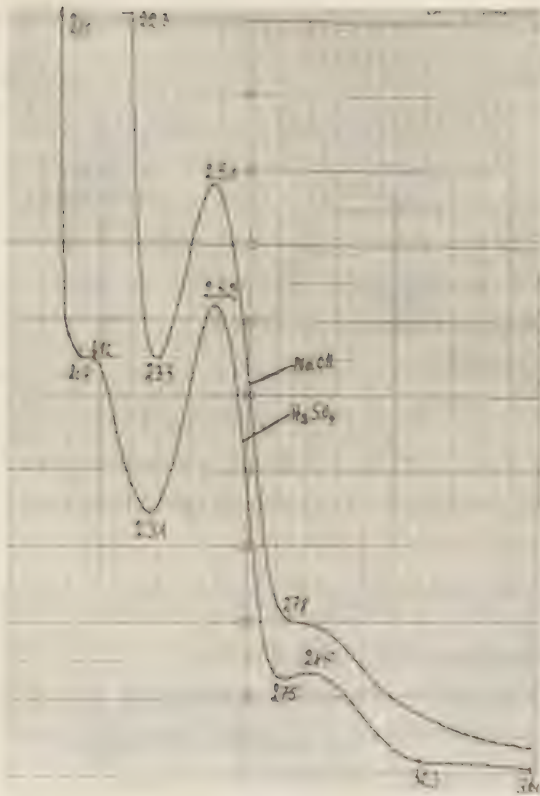


Abb. 2: UV-Absorptionskurve von Insidon-Reinsubstanz,
gelöst in 0,5 N H₂SO₄

Trägerma- terial und Laufmittel- system	<u>Papier-</u> <u>chromatographie</u>	<u>Dünnschicht-</u> <u>chromatographie</u>
	A	B
Betrachtung im UV-Licht (254 nm)	1 ♂ als rosa Fluor- eszenz 4 ♂ - erst hier typ. gelb-rosa Fluoreszenz	0,5 ♂ schwache Ab- sorption 1 ♂ deutliche Absorption
Farbreaktion mit Dragendorff's Reagenz	4 ♂ schwache Orange- färbung	2 ♂
Spektralpho- tometrische Messung der Absorption im UV-Licht (360-220 nm)	1 ♂ /ml	2 ♂ /ml
x)		

Tab. 2: Nachweisgrenze des Insidons

A	Papier:	Schleicher und Schüll 2043 b)
	Laufmittel:	Butanol, gesättigt mit 15%iger Ameisensäure nach JATZKEWITZ
B	Sorptions- mittel:	Kieselgel HF ₂₅₄ Merck
	Laufmittel:	Methanol:Chloroform:Essigsäure- äthylester (1:2:1)
x)	Messung mit BECKMANN-Spektralphotometer DK 2	
	Elution des Fleckens mit 0,5 N-H ₂ SO ₄ .	

Ab einer Konzentration von 2 ♂ tritt auf den unbesprühten
Dünnschichtplatten unter Lichteinwirkung eine deutliche Gelb-
färbung des für Insidon typischen Absorptionsfleckens auf.

VI. Stoffwechsel beim Warmblüter.

=====

Herrmann (1964) untersuchte erstmalig das Verhalten des Insidons im tierischen Organismus. Als Versuchstiere dienten Kaninchen und Ratten. Nach oraler Applikation verschwindet Insidon rasch aus dem Plasma, wobei sich bereits eine Stunde danach Maximalwerte in den Organen finden, die in den folgenden zwei Stunden aber relativ rasch abnehmen. Auch nach iv.-Injektion ist Insidon im Blut nur in niedrigen Konzentrationen zu finden. In der Verteilung jedoch ergeben sich je nach der Applikationsart Unterschiede; so führt eine orale Verabreichung zu einer hohen Konzentration in der Leber und einer geringen in der Lunge, während nach iv.-Gabe niedrige Leberkonzentrationen, dafür aber höchste Konzentrationen in Lunge und Gehirn zu verzeichnen sind.

Die Untersuchungen über die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten im Harn erfolgte mit Hilfe einer Methylorange-Methode und der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G nach Stahl im Fließmittel Methanol:Chloroform:conc.Ammoniak (75:25:1,5).

Das Chromatogramm des bei pH 9,5 mit Äthylenchlorid hergestellten alkalischen Extraktes gab folgende Auftrennung:



Abb. 3: Schematische Darstellung der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung von Extrakten aus Kaninchenharn.
Sorptionsmittel: Kieselgel nach Stahl
Laufmittel: Methanol:Chloroform:Ammoniak (75:25:1,5)
Nachweis: Im UV-Licht (254 nm) und mit Dragendorff's Reagenz
Extrakte: a = Insidon
 b = Harnextrakt vom Kontrolltier
 c = Harnextrakt vom Insidon-Tier
 c = a + c

0, 2; 4 und 6 sind gelb fluoreszierende Flecken, wobei 6 mit Insidon identisch ist. Dazwischen liegen die blau fluoreszierenden Flecken 1, 3 und 5 und über dem von Insidon eine weitere blaue Fluoreszenz, die jedoch auch im Harn unbehandelter Tiere auftritt. Sie umschließt beim Harnextrakt behandelter Tiere einen auch im sichtbaren Licht roten Flecken, bei dem es sich um einen Artefakt handeln kann, da die Rotfärbung von Harnextrakten beim Stehenlassen intensiver wird. Positive Reaktion mit Dragendorff's Reagenz (braunrot) zeigten alle gelb fluoreszierenden Substanzen. Die blauen Fluoreszenzen blieben unangefärbt, außer derjenigen des Leerharns, die sich schwach gelb anfärbt. Die mit Dragendorff's Reagenz braun-

rot erscheinenden Fluoreszenzen werden als Stoffwechselprodukte des Insidons angesprochen. Nicht entschieden werden konnte, ob auch die blau fluoreszierenden Flecken 1, 3 und 5 Stoffwechselprodukte von Insidon sind. Es wurde erwogen, ob es sich auch um normale Ausscheidungsprodukte handeln könnte, die bei Applikation von Insidon vermehrt im Harn auftreten.

Als Konjugate liegen Insidon und seine chemisch nahe verwandten Metaboliten nur zum kleinen Teil vor, denn die mit der Methylorange-Methode im Harn erfaßbaren Stoffe werden sowohl nach saurer Hydrolyse als auch nach Glucuronidase-Einwirkung nur um etwa ein Drittel vermehrt. Insidon wird im Kaninchenharn nur zu etwa 1 % der verabreichten Dosen in unveränderter Form ausgeschieden, was für den weitgehenden Abbau im Organismus spricht.

VII. Stoffwechseluntersuchungen beim Menschen.

Die ersten Untersuchungen in dieser Richtung wurden von Drabner, Bauer und Schwerd (1966) an Patientenurin nach therapeutischen Dosen durchgeführt.

Die Reaktionen nach CRONHEIM-WARE und FORREST verliefen im Urin bei therapeutischer Dosierung selbst nach siebentägiger Aufnahme des Medikamentes negativ.

Die papierchromatographische Auftrennung (Papier: Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) des alkalischen Chloroformextraktes in aufsteigender Methode ergab im sauren Laufmittelgemisch (n-Butanol-15%ige Ameisensäure-H₂O = 12:1:7 nach JATZKEWITZ)

4 Ausscheidungsprodukte mit Rf-Werten von 0,38, 0,56, 0,85 und 0,65, wobei letzteres die unveränderte Substanz darstellt. Im alkalischen Laufmittelgemisch (n-Butanol, gesättigt mit 5-N Ammoniak nach ALGERI und WALKER) wurden 3 Ausscheidungsprodukte mit Rf-Werten von 0,57, 0,93 und 0,91 ermittelt. Die Fraktion mit dem Rf-Wert von 0,91 stellt die unveränderte Substanz dar.

Bei der papierchromatographischen Auftrennung im sauren Laufmittelgemisch ergaben die Fraktionen mit den Rf-Werten zwischen 0,42 und 0,59 sowie 0,65 dem Insidon entsprechende UV-Absorptionskurven.

Bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen auf Kieselgel G-Platten (Merck) im Laufmittelgemisch Methanol: Chloroform (1:2), dem 1 Tropfen Triäthanolamin zugesetzt war, wurden 7 Ausscheidungsprodukte mit folgenden Rf-Werten ermittelt: 0,09; 0,17; 0,32; 0,55; 0,85; 0,95 und 0,60, wobei der letzte Wert wiederum die unveränderte Substanz bedeutet. Nur die Fraktionen mit Rf-Werten zwischen 0,09 und 0,17 sowie 0,60 ergaben die für Insidon kennzeichnenden UV-Absorptionskurven. Die übrigen Flecken zeigten uncharakteristische Kurvenbilder.

Opi Pramol war bei einer Dosierung von 150 mg Wirkstoff /die noch 24 Stunden nach Absetzen des Medikamentes im Urin nachweisbar, nach 36 Stunden zeigte sich nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung des alkalischen Extraktes nur noch eine angedeutete Anfärbung mit Dragendorff's Reagenz und ein schwach ausgebildetes Maximum bei 253 nm; nach 48 Stunden

waren alle Reaktionen negativ. Irgendeine Angabe über das Mengenverhältnis der Metaboliten wurde von den Autoren nicht gemacht.

Untersuchungen an einem Suicidfall mit tödlichem Ausgang (Angst und Mitarbeiter 1967) zeigten nach dünnstichtochromatographischer Auftrennung des alkalischen Harnextraktes qualitativ ein ähnliches Metabolitenmuster wie bei den tierexperimentellen Untersuchungen von Herrmann (1964). Nach Angaben von Angst, Brandenberger und Herrmann (1967) treten jedoch mehr Iminostilben und wenig Opipramol und hydroxylierte Stoffwechselprodukte auf.

Chemische Untersuchungen von Urin- und Schweißproben während einer accidentellen Intoxikation bei einem Kinde (Hohenauer 1966) ergaben in Urin und Schweiß etwa gleiche Insidon-Konzentrationen, die jeweils etwa 1 % der aufgenommenen Dosis betrugten.

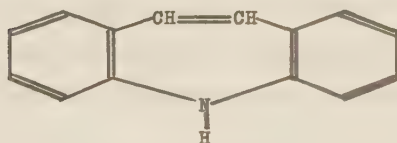
VIII. Iminostilben als Stoffwechselprodukt des Opipramol. =====

Iminostilben als Stoffwechselprodukt des Insidons wurde bereits von Angst, Brandenberger und Herrmann (1967) angegeben und auch bei unseren Untersuchungen durch Rf-Wert, Anfärbbarkeit mit Dragendorff's Reagenz und UV-Spektrogramm nachgewiesen. Wegen seines interessanten chemischen Verhaltens und, da ihm als Grundkörper der Iminodibenzylreihe, über die Schindler und Blattner (1961) und Craig und Mitarbeiter (1961) ausführlich berichtet haben, einige Bedeutung zukommt (Tofranil z.B. ist ein basisch acyliertes Imino-

stilbenderivat), wollen wir im folgenden näher auf die chemischen Eigenschaften des Iminostilbens und seinen qualitativen Nachweis im biologischen Material eingehen.

1.) Chemische Eigenschaften.

Iminostilben ist ein 5 H - Dibenz [b,f] azepin und hat folgende Strukturformel:



5 H - Dibenz [b,f] azepin

Die Substanz besteht aus orange gefärbten Kristallen. Sie hat einen Schmelzpunkt von 215° (Schmelzbeginn bei 206° , Schmelzpunktbestimmung mit Kofler-Heizblock, Temperatursteigerung ca. $3^{\circ}/\text{min.}$ im Schmelzbereich; Schindler und Blattner 1961 geben als Schmelzpunkt 206° an) und ist sublimierbar. Bei unseren Versuchen mit Reinstanz bildeten sich orangefarbene Sublimate bei einer Temperatur von ca. $103/109^{\circ}$, 96° , 88° , gelborangefarbene Kristalle bei ca. 82° und gelbe Kristalle bei ca. $60 - 64^{\circ}$. Das Sublimat bei 103° erwies sich nach Schmelzpunkt (215°) und nach Mischschmelzpunkt (216°) als mit Iminostilben identisch. Die UV-Absorptionskurven der bei 103° und bei 60° gebildeten und in Äthanol und $0,5\text{ N H}_2\text{SO}_4$ gelösten Kristalle stimmten ebenfalls mit der des Imino-

stilbens überein (Maxima bei Lösung in Äthanol: 258/259 nm, bei Lösung in 0,5 N H_2SO_4 : 254 nm, 353 nm und 336 nm, bei nachfolgender Alkalisierung mit conc. NaOH: 248 nm; s. auch Tab. 4 auf S.23).

Die Löslichkeit des Iminostilbens unterscheidet sich von der des Insidons ganz erheblich. Während Insidon eine ausgesprochen gute Wasserlöslichkeit zeigt, ist Iminostilben in Wasser unlöslich, ebenfalls in 0,5 N H_2SO_4 oder Lauge (NaOH), dagegen sehr gut löslich in Äther und Chloroform, gut löslich in Methanol, Äthanol, Acetonitril und Benzol. Die frisch hergestellte Lösung des Iminostilbens in den genannten Lösungsmitteln sieht gelb aus. Bei älteren Lösungen wird die Gelbfärbung durch die Lichteinwirkung intensiver und nimmt einen orangenen Farbton an.

2.) Qualitativer Nachweis.

Die Reaktion nach CRONHEIM-WARE fiel negativ aus, dagegen erwiesen sich die Reaktionen nach FORREST als stark positiv.

Iminostilben ist eine schwache Säure und läßt sich im sauren Milieu (pH-Wert 2,5) mit Äther extrahieren. Bei der papierchromatographischen Untersuchung (Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) ergab sich für das Iminostilben (gelöst in Äthanol) im alkalischen (N-Butanol, gesättigt mit 5 N Ammoniak nach ALGERI und WALKER) und sauren Laufmittelgemisch (N-Butanol, gesät-

tigt mit 15%iger Ameisensäure nach JATZKEWITZ) ein Rf-Wert von 0,85 (0,78-0,93), im UV-Licht (254 nm) erkennbar als Absorption, die von einer blauen Fluoreszenz ringförmig umgeben oder direkt begrenzt wird.

Bei den dünnschichtchromatographischen Ermittlungen in den Laufmittelgemischen Methanol:Chloroform:conc. NH_3 (75:25 + 1,5), Methanol:Chloroform = 1:2 + 2 Tropfen Triäthanolamin und Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester (1:2:1) ergaben sich fast dieselben Rf-Werte (0,69-0,89), die in Tab. 3 wiedergegeben sind.

Laufmittel	Rf-Werte
Methanol:Chloroform:conc. NH_3 (75+25+1,5)	0,78 bis 0,85
Methanol:Chloroform:Triäthanolamin (1:2 + 2 Tropfen)	0,85 bis 0,89
Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester (1:2:1)	0,69 bis 0,72

Tab. 3: Rf-Werte des Iminostilbens in verschiedenen Laufmitteln.

Iminostilben zeigt sowohl auf Kieselgel G-Platten als auch auf Kieselgel HF-Platten Merck im UV-Licht (254 nm) die mit der Fluoreszenz gekoppelte Absorption.

In älteren Lösungen scheinen sich wie beim Insidon Zerstellungsprodukte zu bilden. So zeigte sich bei der Papierchromatographie einer älteren äthanolischen Lösung des Iminostilbens im alkalischen (N-Butanol, gesättigt

mit 5 N Ammoniak nach ALGERI und WALKER) und sauren Laufmittelgemisch (N-Butanol, gesättigt mit 15%iger Ameisensäure (12:1:7) nach JATZKEWITZ) eine Auftrennung des Iminostilbens in drei bis vier Flecken mit Rf-Werten von 0,64 (schwache blaue Fluoreszenz), 0,74 (blaue Fluoreszenz), 0,92 (Absorption) und 0,96 (rosa Fluoreszenz), wobei auch die sonst zusammenhängende blaue Fluoreszenz ($R_f = 0,74$) und Absorption ($R_f = 0,92$) vollständig voneinander getrennt waren. Mit Dragendorff's Reagenz färbte sich das Zentrum der blauen Fluoreszenz ($R_f = 0,74$) und die Absorption orange bzw. braun-orange an, die anderen beiden Fluoreszenzen zeigten keine Farbentwicklung.

Auch bei der dünnstschichtchromatographischen Untersuchung älterer äthanolischer Lösungen des Iminostilbens im Laufmittelgemisch methanol:Chloroform:essigsäureäthylester (1:2:1) konnten weitere drei Flecken entdeckt werden: unterhalb der eigentlichen Iminostilbenfraktion eine grünlich-weiße Fluoreszenz, darunter eine schwache blaue und in Startnähe nochmals eine blaue Fluoreszenz. Diese drei Flecken ließen sich mit Dragendorff's Reagenz nicht anfärben.

Die einzelnen bei der Papierchromatographie älterer Lösungen von Iminostilben in saurem und alkalischem Laufmittelgemisch mitunter auftretenden Fraktionen wurden UV-spektrographisch ausgemessen. Die rosa Fluoreszenz ($R_f = 0,96$) gab eine Iminostilben-ähnliche Absorptions-

kurve, die im sauren Milieu ($0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$) ein Maximum bei 254/255 nm (Schulter bei 248 nm) und ein kleines Maximum bei 352 nm, im alkalischen Milieu (NaOH) ein Maximum bei 248 nm (Schulter bei 240 nm) aufwies.

Dieses UV-Spektrogramm zeigt weitgehende Übereinstimmung mit dem zweier Fraktionen im alkalischen Extrakt von Mageninhalt (bei Rf-Wert 0,48 und 0,76, s. S. 40) und Harn (bei Rf-Wert 0,61 und 0,76, s. S. 49).

Das UV-Spektrogramm der Fluoreszenz ($R_f = 0,65$) ergab im sauren Milieu ($0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$) eine zweigipflige Kurve mit Maxima bei 268 nm und 256 nm, im alkalischen Milieu (NaOH) fand sich nur ein angedeutetes Maximum bei 256 nm. Die Absorption ($R_f = 0,93$) und die Fluoreszenz ($R_f = 0,76$) gaben im sauren ($0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$) und alkalischen (NaOH) Milieu mit dem Iminostilben übereinstimmende UV-Absorptionskurven. Bei Verwendung von Acetonitril oder Äthanol als Elutionsmittel wies nur das UV-Spektrogramm der blauen Fluoreszenz ($R_f = 0,76$) die zusätzlichen kleinen Maxima bei 352 nm, 336 nm und 343 nm auf, wie sie typisch für Iminostilben im sauren Milieu ($0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$) sind (s. Tab. 4 und Abb. 4). Dagegen zeigte sich bei den Hauptmaxima gegenüber der Reinsubstanz eine Verschiebung zum kurzwelligen UV-Bereich hin, und zwar lag das Maximum bei Elution mit Äthanol bei 248 nm und bei Elution mit Acetonitril bei 247 nm (vgl. Tab. 4 und Abb. 4).

Bei Elution der Absorption ($R_f = 0,93$) mit Äthanol bzw.

Acetonitril fanden wir im UV-Spektrogramm bei beiden Elutionsmitteln ein dem Iminostilben entsprechendes Maximum von 256 nm.

Die gemeinsame Elution der Absorption ($R_f = 0,93$) und der Fluoreszenz ($R_f = 0,76$) mit Äthanol und nachfolgende UV-spektrophotometrische Ausmessung ergab bei 249 nm ein Maximum und bei 258 nm eine Schulter; außerdem war bei 354 nm ein kleines Maximum vorhanden.

In Tab. 4 sind die UV-Absorptionsmaxima des Iminostilbens in verschiedenen Lösungsmitteln angegeben.

Lösungsmittel		Maxima	Minima
	Haupt- maximum		
Methanol	256	294	235 281
Äthanol	256/ 258	254 Schulter) nicht 248 Schulter) immer vor- handen 296	234 283/284
Borat-Puffer pH 10	248	353(wenig ausge- prägt)	236 281
verd.NaOH	248	352) (nur ange- 335) deutet)	235 282
Acetonitril	256/ 257	296 249 Schulter (nicht immer vorhan- den)	234/36/38 281/282
0,5 N H_2SO_4	254/ 255	282 353 336	235 271/273 321/327

Tab. 4: UV-Absorptionsmaxima und -minima des Iminostilbens in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die Maxima bei 294/296 nm (bzw. 282 nm) sind nicht immer deutlich zu erkennen und verschwinden bei niedrigeren Konzentrationen unter Umständen vollständig.

Für den qualitativen Nachweis des Iminostilbens in der Papier- und Dünnschichtchromatographie eignet sich wegen seines charakteristischen UV-Absorptionsspektrums (schmale Absorptionskurve mit Nebenmaxima bei 353 nm und 336 nm) besonders 0,5 N H_2SO_4 als Lösungsmittel. Obwohl die Reinsubstanz in H_2SO_4 nahezu unlöslich ist, führt die Elution aus dem Papierchromatogramm und aus Kieselgel HF auch quantitativ zu recht brauchbaren Ergebnissen. Dennoch sind für die quantitative Ermittlung methanol, Äthanol oder Acetonitril infolge ihrer besseren Löslichkeit und damit ihres besseren Elutionsvermögens vorzuziehen. In Abb. 4 a und b sind die UV-Absorptionskurven des in 0,5 N H_2SO_4 bzw. in Äthanol gelösten Iminostilbens gegenübergestellt, wobei das in Abb. 4 b wiedergegebene UV-Spektrogramm dasselbe Bild ergibt wie das von in Acetonitril gelöstem Iminostilben.

Abb. 4 a: UV-Absorptionskurve des Iminostilbens bei Verwendung von 0,5 N H_2SO_4 als Lösungsmittel

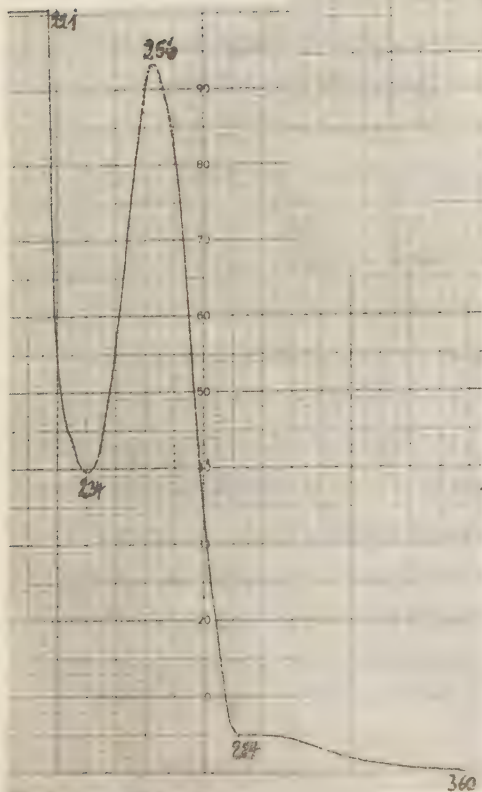
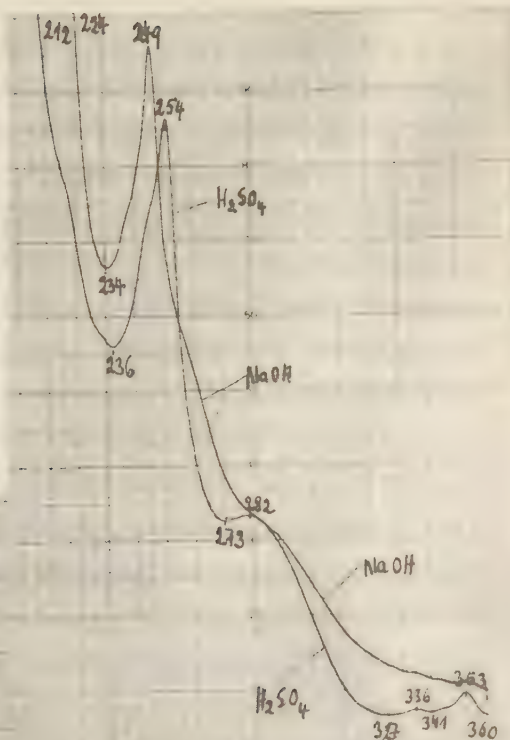


Abb. 4 b: UV-Absorptionskurve des Iminostilbens bei Verwendung von Athanol als Lösungsmittel

Auf die große Ähnlichkeit des UV-Absorptionsspektrums von Abb. 4 a mit dem des Acridins, insbesondere des Acridinium-Ions (Maxima bei 254, 336, 353, 385 und 400 nm im Lösungsmittel: Wasser + 10 Vol.% Äthanol + 2 M HCl) und einigen seiner Substituenten sei hierbei hingewiesen (UV-Atlas of Organic Compounds, Vol. III). Das ist nicht verwunderlich, da z.B. das 9-Methylacridin isomer zu Iminostilben ist und in vitro aus seinem 5-Acetylderivat durch Einwirkung von Säure unter Umlagerung der Acetylgruppe und Ringverengung entsteht. Diese Umlagerung gilt als Gegenstück zur säurekatalysierten Ringerweiterung des 9-Hydroxymethyl-9, 10-dihydroacridins (= 9-Acridane-methanol) zu Iminostilben (Schindler und Blattner 1961, Bergmann und Rabinovitz 1960, Craig und Mitarbeiter 1961).

Huisgen, Laschtuvka und Bayerlein (1960) haben sich eingehend mit dem Studium des Iminostilbens (2,3; 6,7-Dibenzoozepin) befaßt:

Durch Einbeziehung des leicht isomerisierbaren 1 H-Azepins in Benzolkern kommt es zu einer Mesomeriestabilisierung und Hemmung von Isomerisierungen. Im Iminostilben vermag also der 7-gliedrige Ring nicht mehr, den cyclisch konjugierten Zustand zu verlassen. Im räumlichen Bau ist für das Dibenz-azepin folgende Alternative anzusehen:

- a) bestmögliche Erhaltung des normalen Bindungswinkels zwischen den Benzolkernen und der Äthylenbrücke sowie deren Iminostickstoff,

b) ebener 7-gliedriger Ring.

Ohne einen hohen Mesomeriegewinn im Azepinring werden die normalen Kopplungskräfte zwischen den Benzolkernen und der Äthylenbrücke sowie dem Iminostickstoff das System nicht in die Koplanarität zu zwingen vermögen. Zwischen den beiden Extremen a) und b) ist ein kontinuierlicher Übergang möglich. Nach Huisgen, Laschtuvka und Bayerlein (1960) würde der Azepinring in Wannenform vorliegen, wobei die Äthylenbrücken und der Stickstoff aus der Ebene der C-Atome 2, 3, 6 und 7 nach der gleichen Seite herausragen; hierbei ist das System immer noch winkelgespannt.

Iminostilben und sein Methylderivat absorbieren wesentlich langwelliger als ihre niederen Vinylogen Carbazol und dessen Methylderivat (Huisgen, Laschtuvka und Bayerlein 1960). Nach unseren Ergebnissen zeigt auch Indisidon diese langwelligere Absorption. Seinen Derivaten gegenüber absorbiert Iminostilben wiederum wesentlich langwelliger. Diese langwelligere Absorption (etwa ab 460/470 nm bei Verwendung von Äthanol als Lösungsmittel) ist entsprechend den Angaben von Schindler und Blattner (1961) bezeichnend für Iminostilben. Allgemein ist zu sagen, daß die Einführung einer Seitenkette am Iminostickstoff zu einer kurzwelligeren Absorption führt, und zwar ist die Absorption um so kurzwelliger je länger die Seitenkette ist.

Huisgen, Laschtuvka und Bayerlein (1960) berichten dar-

über, daß das N-Methylderivat des Iminostilbens in der Lösungsmittelabsorption (Äthanol als Lösungsmittel) einen beachtlichen hypsochromen Effekt zeigt (das N-Methylderivat ist gelb gefärbt), der dem Unterschied in der Kristallform des Iminostilbens und seines N-Methylderivates entspricht. Dieser Effekt fehlt in der Carbazolreihe. Die vorgenannten Autoren halten es für möglich, daß der spektrale Effekt auf einen sterischen Einfluß zurückgeht. Die Wechselbeziehung der N-Methylgruppe mit den Wasserstoffatomen der benachbarten Benzolkerne ist in einem koplanaren tricyclischen System wesentlich stärker als in einer durchgebogenen Konfiguration. Die N-Methylgruppe könnte bei dieser Pressung der Wirkungsradien eine stärkere Abweichung von der Koplanarität auslösen als sie beim Iminostilben vorhanden ist. Demnach würde der hypsochrome Effekt auf eine höhere Konjugationsschwächung zurückgehen. Dieser hypsochrome Effekt verschwindet in den UV-Absorptionsspektren des Iminostilbens und seines N-Methylderivates bei Verwendung von conc. H_2SO_4 als Lösungsmittel. Die Protonenaddition am Stickstoff hat eine Unterbrechung der cyclischen Konjugation zur Folge, die sich in einer wesentlich kurzwelligeren Lichtabsorption kundtut.

Ähnlich wie die Protonierung des Stickstoffs die cyclische Konjugation im Iminostilben unterbricht, ist dies auch bei der Acetylierung der Fall, wobei eine farblose Verbindung entsteht (Schindler und Blattner 1961).

ebenso wie die Acetylierung führt demnach jede Einführung einer Seitenkette zu einer Unterbrechung der cyclischen Konjugation.

Daß diese Beziehungen auch im Metabolismus des Insidons bzw. des Iminostilbens eine große Rolle spielen, ist offensichtlich und das verschiedene Verhalten der Iminostilbenreinsubstanz in manchen Lösungsmitteln damit zu erklären. So fanden wir, daß es gerade bei Verwendung von Acetonitril als Lösungs- bzw. Elutionsmittel unabhängig von den verwendeten Laufmittelgemischen neben dem in Tab. 4 angegebenen UV-Spektrogramm zu folgenden Maximumverschiebungen kommen kann, die in Abb. 5 wiedergegeben sind. Zwischen Acetonitril, das in zwei tautomeren Formen vorkommen kann, und dem Iminostilben kommt es wahrscheinlich zu intermolekularen Beziehungen und dadurch bedingten Bindungsverschiebungen im Iminostilbenmolekül.

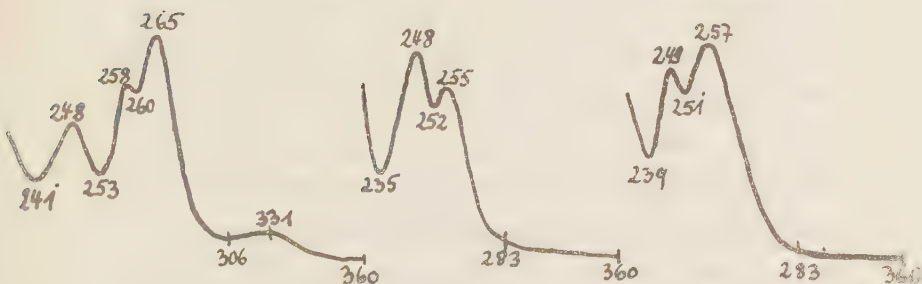


Abb. 5: Mögliche Maximumverschiebungen bei der Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel.

Es soll hierbei ferner auf eine Arbeit von Butenandt, Riekert und Neubert (1957) hingewiesen werden, in der Produkte der Alkalibehandlung von 5-Acetyl-Phenoxazonen bzw. Oxydationsprodukte des 2-Amino-3-hydroxy-acetophenons beschrieben werden, die als chinoiden Abkömmlinge des gleichen Dibenzo-azepins betrachtet und bewiesen werden, wobei diesem heterocyclischen 7-Ringsystem eine große Bildungstendenz zugeschrieben wird.

Butenandt und Mitarbeiter (1957) führen die in alkalischer Lösung beim 5-Acetyl-Phenoxazon über eine Phenylchinonimim-Zwischenstufe auftretende irreversible Wasserabspaltung und Bildung eines heterocyclischen 7-Ringsystems auf das Vorhandensein der Acetylgruppe im Acetyl-trihydroxy-phenylchinonimin zurück, wobei die Acetylgruppe mit einer Hydroxylgruppe des Chinonkerns reagieren soll. Durch Enolisierung entsteht das 3, 6, 10-Trihydroxy-5-dibenz [b,f] -azepin-chinonimin. Für diese innermolekulare Kondensation zwischen C-Acetyl- und Chinonhydroxylgruppe des Acetylphenylchinonimins unter Ausbildung des Azepinsystems und dem Vorkommen der gebildeten Verbindung in enolisierter Form wird der Beweis geführt.

Bei der Darstellung von 5-Dibenz [b,f] -azepin-chinonimin durch Oxydation von 2-Amino-Acetophenon entstehen tautomere Formen derselben Verbindung, von denen die eine 1 Mol Kristallwasser fester zu binden vermag (roter Farbstoff) als die andere (gelber Farbstoff).

Nach Butenandt, Siekert und Neubert (1957) entstehen die natürlichen Ommochrome in vivo stets durch Oxydation von o-Amino-phenolen. Es muß daher damit gerechnet werden, daß auch dabei Verbindungen von Azepinstruktur mit einem stickstoffhaltigen 7-Ring entstehen können.

Die Iminostilbene sind Stoffe, deren Iminogruppe sich, wie bei Iminodibenzyl und Phenothiazin (Schindler und Häfliger 1954), durch Natrium- und Lithiumamid leicht metallisieren läßt. Sie bieten somit für weitere Umsetzungen verschiedene Möglichkeiten, worauf auch eine Anzahl basisch alkylierter Iminostilbenderivate beruht (Schindler und Blattner 1961).

Andererseits kann eine derartige Metallisierung beim Abbau des Insidons bzw. beim Metabolismus des Iminostilbens eine Rolle spielen.

Aus unseren Untersuchungen bezüglich der Anfärbbarkeit ergab sich, daß die Absorption und die blaue Fluoreszenz des Iminostilbens beim Besprühen mit Dragendorff's Reagenz (Merck; Reagenz Nr. 92) orange wird. Dadurch, daß im allgemeinen die Absorption und Fluoreszenz des Iminostilbens eng zusammenhängen, bzw. die Absorption von der Fluoreszenz ringförmig umgeben wird, erscheint nur die Absorption als mit Dragendorff's Reagenz anfärbbar, wobei nun aber eine Braunfärbung eintritt, die bei niedrigeren Konzentrationen unter Umständen erst nach Abtrocknen des Chromatogramms sichtbar wird. Mit Diazo-Reagenz

(Merck; Reagenz Nr. 51) tritt eine Gelb-orangefärbung, mit HgNO_3 (Merck; Reagenz Nr. 195) bzw. EHRlich-Reagenz (Merck; Reagenz Nr. 69) eine schwache bzw. kräftige Gelbfärbung der Absorption ein.

Unter Lichteinwirkung zeigte die Fluoreszenz eine helle Gelbfärbung wie sie auch bei Insidon auftritt, die Absorption dagegen eine Rosafärbung, die mit der Zeit intensiver wird. Die Farbentwicklung unter Lichteinwirkung tritt besonders deutlich bei der dünn-schicht-chromatographischen Aufarbeitung hervor, während sie bei der papier-chromatographischen Untersuchung nicht so ausgeprägt ist.

Die Nachweisgrenze des Iminostilbens gibt nachfolgende Tabelle wieder:

Träger und Laufmittel- system	Papier- chromatographie	Dünnschicht- chromatographie
	A	B
Betrachtung im UV-Licht (254 nm)	1γ - schwache blaue Fluoreszenz 2γ - Fluoreszenz deutlich er- kennbar, schwache Ab- sorption 3γ - Fluoreszenz und Absorption deutlich er- kennbar	0,5γ - schwache blaue Fluoreszenz 1γ - deutliche Fluoreszenz, schwache Ab- sorption 2γ - deutliche Fluoreszenz und Absorption
Farbreaktion mit Dragendorff's Reagenz	2γ - schwache Braunfärbung der Absorption 4γ - deutliche Braunfärbung der Absorption	0,5γ - schwache Braunfärbung der Absorption 1γ - deutliche Braunfärbung der Absorption
Spektralphoto- metrische Messung der Absorption im UV-Licht (360-220 nm) nach Elution	1γ/3ml (Elution mit Acetoni- tril) 2γ/3ml (Elution mit Methanol bzw. Äthanol)	0,5γ/3ml (Elution mit Acetoni- tril)
x)		

Tab. 5: Nachweisgrenze des Iminostilbens (Lösung der Rein-
substanz in 96%igem Äthanol)

- A Papier: Schleicher und Schüll 2043 b
 Laufmittel: Butanol, gesättigt mit 15%iger
 Ameisensäure nach JATZKEWITZ
 und Butanol, gesättigt mit 5 N
 Ammoniak nach ALGERI und WALKER
- B Sorptionsmittel: Kieselgel HF₂₅₄ Merck
 Laufmittel: Methanol:Chloroform:Essig-
 säureäthylester (1:2:1)
- x) Messung mit BECKMANN-Spektralphotometer DK 2

Ab einer Konzentration von 1 % (Fluoreszenz) bzw. 2 % (Absorption) tritt auf den unbesprühten Dünnschichtplatten unter Lichteinwirkung eine deutliche Gelbfärbung der Fluoreszenz bzw. Rosafärbung der Absorption auf.

Iminostilben liegt wahrscheinlich in zwei Zustandsformen vor. Darauf weist die Tatsache hin, daß Iminostilben im UV-Licht (254 nm) als Fluoreszenz und Absorption erscheint und daß unter Lichteinwirkung einerseits eine Gelbfärbung der Fluoreszenz und andererseits eine Rosafärbung der Absorption eintritt. Ferner sprechen dafür auch die bei Verwendung von Acetonitril als Lösungs- bzw. Elutionsmittel auftretenden zwei verschiedenen Maxima entsprechend den verschiedenen Konzentrationen, wobei das Maximum bei 248 nm der Fluoreszenz und das Maximum bei 254 nm der Absorption zukommt. Die Farbveränderungen am Licht könnten durch oxydative Prozesse bedingt sein.

IX. Eigene Beobachtungen.

=====

Im folgenden soll über einen Suicidfall berichtet werden, der Anlaß zu weiteren Untersuchungen über den Stoffwechsel des Insidons beim Menschen gab.

1.) Vorgeschichte und klinischer Befund.

Die 33-jährige Patientin, Mutter von zwei Kindern, lebte in schwierigen familiären Verhältnissen und litt unter

einer panischen Angst vor einer erneuten Schwangerschaft, weswegen auch die sexuell-ehelichen Beziehungen gestört gewesen waren. In Zusammenhang damit traten depressive Verstimmungen auf; deshalb wäre die Patientin auch in nervenärztlicher Behandlung gewesen. Die Mutter sei wegen agitierter Depressionen wiederholt in der Nervenklinik behandelt worden. Am 29.9.1966 wurde die Patientin in bewußtlosem Zustand aufgefunden, nachdem sie etwa eine halbe Stunde zuvor erklärt hatte, ihr sei nicht gut.

Um 10.00 Uhr erfolgte die Klinikaufnahme der bewußtlosen Patientin. Das Gesicht war leicht gerötet, die Haut am ganzen Körper fühlte sich heiß an, die Pupillen waren mittelweit und reagierten nicht auf Lichteinfall; der Cornealreflex ließ sich nicht auslösen, die Muskulatur war atonisch und schlaff, Patellar- und Achillessehnenreflex fehlten; die Atmung ging oberflächlich, die Pulsfrequenz betrug 90/min. und der Blutdruck 50/70 mm Hg (auch bei mehrmaliger Messung).

2.) Klinischer Verlauf.

Nach Magenspülung und wiederholten hochdosierten Gaben von Eukraton, Cardiazol und Novadral trat erstmals 6 Stunden nach Klinikaufnahme eine deutliche Veränderung des Zustandes auf: kühle Extremitäten, Atmung wieder vertieft und Cornealreflex auslösbar. Gelegentlich traten leichte Krampferscheinungen (tonische Krämpfe) auf, die nach Reduzierung der Eukratonzufuhr aufhörten. Die Pupillen reagierten auf Licht, auf Schmerzreize erfolgte geringe Reak-

tion, die Pulsfrequenz betrug 130/min.; nach wie vor bestand tiefe Bewußtlosigkeit. Nach einer weiteren Stunde (17.00 Uhr) waren alle Sehnenreflexe wieder auslösbar.

20.00 Uhr: Die Blutdruckwerte lagen bei 130/80 mm Hg; der sonstige Zustand war unverändert. Alle therapeutischen Maßnahmen wurden abgesetzt. Im Laufe der Nacht kehrte das volle Bewußtsein zurück. Für zwei Tage zeigten sich noch dysarthrische Störungen, ansonsten besserte sich der Zustand zusehends, so daß am 13.10.1966 die Entlassung erfolgte.

Nach eigenen Angaben hatte die Patientin 20 Dragées (à 50 mg = 1 g) Insidon, 17 Tabletten Vesparax und 50 Kapseln Librium (à 10 mg) zu sich genommen.

Braunhofer (1962) gibt eine allerdings bei therapeutischer Dosierung geringe Potenzierung von Schlafmitteln und Narcotica durch Insidon an, die hier u.U. eine Rolle gespielt haben kann.

3.) Chemische Untersuchungen.

Zur Prüfung auf Medikamente und für weitere chemische Untersuchungen standen 30 ml Mageninhalt (flüssig, ohne feste Bestandteile) und insgesamt 1600 ml Urin von drei verschiedenen Tagen (vom 29.9., 2.10. und 5.10.1966) zur Verfügung, wovon allerdings 1000 ml vom 7. Ausscheidungstag waren.

Die saure Extraktion von Mageninhalt und Urin erfolgte mit Äther bei einem pH-Wert von 2,5, die alkalische bei

einem pH-Wert von 10,5 durch dreimaliges Ausschütteln mit Chloroform. Als Extraktionsmittel hatte sich Chloroform gegenüber Äthylendichlorid als geringgradig überlegen erwiesen. Im neutralen Milieu wurde mit Essigsäureäthylester extrahiert. Die Extrakte wurden mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und auf dem Wasserbad eingeeengt. Zur Auftrennung derselben bedienten wir uns der papierchromatographischen (Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) und dünnschichtchromatographischen (Kieselgel HF₂₅₄ Merck) Methode. Bei der Papierchromatographie verwendeten wir für die sauren Extrakte ein alkalisches Laufmittelgemisch (N-Butanol, gesättigt mit 5 N Ammoniak nach ALGERI und WALKER), für die alkalischen und neutralen Extrakte ein saures (N-Butanol, gesättigt mit 15%iger Ameisensäure nach JATZKEWITZ). Bei der Dünnschichtchromatographie hatte sich für alle Extrakte das Laufmittelgemisch Methanol: Chloroform:Essigsäureäthylester (1:2:1) als recht brauchbar erwiesen (Drabner und Mitarbeiter 1966).

Zum Nachweis dienen folgende Reagenzien:

Dragendorff's Reagenz (Merck; Reagenz Nr. 92)

Diazotierte Sulfanilsäure (Merck; Reagenz Nr. 51)

Quecksilber (I)-nitrat (Merck; Reagenz Nr. 195)

Ehrlichs Reagenz (Merck; Reagenz Nr. 69)

Reagenz auf phenolische Gruppen (Katz und Nieh 1967):

(Puffer: Pufferlösung pH 8; gleiche Volumina von

a) und b)

a) 0,5 N Ammoniak

b) 104,5 g K_2HPO_4 und 72,3 g KH_2PO_4

je Liter aqua dest.

Reagenz A: 0,5 g 4-Aminoantipyrin in 100 ml
Puffer pH 8

Reagenz B: 2,0 g $K_3Fe(CN)_6$ in 100 ml aqua dest.)

Als Vergleichssubstanzen standen Insidon und Iminostilben
zur Verfügung. X)

Die UV-Absorptionskurven wurden mit dem BECKMANN-Spek-
tralphotometer DK 2 aufgezeichnet. Für den qualitativen
Nachweis des Iminostilbens verwendeten wir 0,5 N H_2SO_4 ,
für den quantitativen Acetonitril als Lösungsmittel. Alle
übrigen Fraktionen wurden für die qualitative und quanti-
tative Auswertung mit 0,5 N H_2SO_4 (spätere Alkalisierung
mit conc. NaOH) eluiert.

a) Mageninhalt.

a₁) saurer Extrakt

Mit dem alkalischen Laufmittelgemisch konnte pa-
pierchromatographisch im sauren Extrakt nach Rf-
Wert (0,89), Anfärbbarkeit mit $HgNO_3$ und UV-Spek-
trogramm Barbiturat nachgewiesen werden. Bei der
dünnschichtchromatographischen Untersuchung wur-
de im sauren Extrakt ebenfalls Barbiturat gefun-
den.

a₂) alkalischer Extrakt

Im sauren Laufmittelgemisch ergaben sich papier-
chromatographisch mit dem alkalischen Extrakt drei
Flecke: rosa bzw. gelbe Fluoreszenz bei $R_f = 0,24$
und 0,55 und eine blaue Fluoreszenz bei $R_f = 0,34$.

X) Wir danken der Firma Geigy für die Überlassung der
Reinsubstanzen.

Die rosa und gelbe Fluoreszenz reagierten mit Dragendorff's Reagenz. Im UV-Spektrogramm stimmte nur die Fraktion mit $R_f = 0,55$ vollständig mit Insidon überein, während sich für die Fraktion mit $R_f = 0,24$ und $0,34$ eine stärkere Maximaverschiebung zwischen saurem (Maximum bei 254 nm) und alkalischen Milieu (Maximum bei 249 nm) ergab. Die Insidonfraktion erschien bei Verwendung des alkalischen Laufmittelgemisches unter R_f -Wert $0,86$.

Da sich dünnschichtchromatographisch im alkalischen Extrakt nicht nur die mit Insidon identische Absorption mit Dragendorff's Reagenz orange anfärbte, sondern auch eine schwache, schlecht abgegrenzte Absorption zwischen dem Insidonfleck und dem Start, erfolgte eine weitere Auftrennung durch insgesamt dreimaligen Lauf mit Zwischentrocknung im gleichen Laufmittel, wobei sich vier - davon drei gut voneinander abgrenzbare - Fraktionen ergaben. Im UV-Bereich zeigte nur Fleck 4, der ebenso weit wie die mitgeführte Referenzsubstanz Insidon gewandert war, eine mit Insidon vollständig übereinstimmende Absorptionskurve, während die Flecken 1, 2 und 3 bereits größere, für Insidon nicht mehr ganz typische Unterschiede in den Maximabereichen des sauren (Maximum bei 254 nm) und alkalischen Milieus (Maximum bei 249 nm) zeigten.

Mit Dragendorff's Reagenz entstand ferner oberhalb der obersten, dem Insidon entsprechenden Absorption ein deutlich orangegefärbter Fleck bei fehlender Absorption oder Fluoreszenz im UV-Licht. Das UV-Spektrogramm, das im sauren Milieu ein angedeutetes Maximum bei 229 nm und im alkalischen Milieu kein Maximum aufwies, konnte nur annähernd dem Atarax zugeordnet werden. Beim Auftragen wesentlich höherer Konzentrationen (strichchromatographische Anreicherung und dreimaliger Lauf im gleichen Laufmittel mit Zwischentrocknung) und Elution der über die ganze Plattenbreite angereicherten Fraktion, die nun als schwache Absorption im UV-Licht sichtbar war, wurde die UV-Absorptionskurve einwandfrei als zu Atarax gehörig identifiziert (deutliches Maximum bei 229 nm, kleines und breites Maximum bei 256/260 nm im sauren Milieu und fehlendes UV-Spektrogramm im alkalischen Milieu). Auf diese gleiche Weise konnte weiterhin Fleck 6 ($R_f = 0,48$) und 8 ($R_f = 0,87$) als schwache Absorption und Fleck 7 ($R_f = 0,76$) als Fluoreszenz entdeckt werden. Mit Dragendorff's Reagenz zeigte nur Fleck 8 eine schwache Orangefärbung. Durch Elution dieser über die gesamte Plattenbreite angereicherten Fraktionen konnten bei Fleck 6 und 7 gleiche UV-Absorptionskurven, die zudem einige Ähnlichkeit zum Iminostilben aufwiesen, und bei Fleck 8 Iminostilben selbst UV-spektrographisch nachgewiesen

werden. Fleck 4 des alkalischen Extraktes wurde nach der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung mit Chloroform (2 x je 25 ml für jeweils 15 Minuten) und Methanol (1 x mit 5,0 ml für 5 Minuten) eluiert. Das Eluat wurde nach Trocknen mit wasserfreiem Na_2SO_4 eingedampft und der Rückstand IR-spektrophotometrisch untersucht (KBr-Preßling). Er konnte als Insidon identifiziert werden.

a₃) neutraler Extrakt

Der neutrale Extraktückstand wies papierchromatographisch im sauren Laufmittel zwei Flecken auf: eine gelbe Fluoreszenz bei $R_f = 0,59$ und eine blaue Fluoreszenz bei $R_f = 0,87$. Die gelbe Fluoreszenz, die bei Verwendung des alkalischen Laufmittels wie die entsprechende Fraktion im alkalischen Extrakt (s. S. 39) unter R_f -Wert 0,86 erschien, färbte sich mit Dragendorff's Reagenz orange an und zeigte eine mit Insidon identische UV-Absorptionskurve, während die blaue Fluoreszenz nur andeutungsweise im sauren Milieu (0,5 N H_2SO_4) ein Maximum bei 255 nm und ein Minimum bei 244 nm aufwies und im alkalischen Milieu (NaOH) überhaupt keine Kurve zeigte. Dagegen färbte sie sich mit Diazo-Reagenz rötlich und mit EHRlich-Reagenz gelbbraun an. Am unbesprühten Chromatogramm bildete sich unter Lichteinwirkung zentral ein roter Fleck aus.

Aus dem neutralen Extrakt des Mageninhaltes trennten sich dünnschichtchromatographisch zwei Flecken: eine Absorption mit einem Rf-Wert von 0,12 (0,10 - 0,12) und eine mit einer blauen (bzw. weißen) Fluoreszenz kombinierte Absorption bei einem Rf-Wert von 0,81. Mit Dragendorff's Reagenz färbte sich nur die untere Absorption orange an, während die obere eine Braunfärbung ergab. Das UV-Spektrogramm zeigte hier eine Übereinstimmung mit der entsprechenden Fraktion wie sie bei der Papierchromatographie des neutralen Extraktes bereits beschrieben wurde. Die unterste Fraktion, die sich vom Start zunächst nicht trennte, konnte durch dreimaligen Lauf im gleichen Laufmittel mit Zwischentrocknung vom Start wegbewegt werden. Dabei trennte sich auch hier zusätzlich eine schwache Fluoreszenz und eine Absorption ab. Das UV-Spektrogramm von Fleck 1 entsprach dem von Fleck 1, 2 und 3 des alkalischen Extraktes, das der Fluoreszenz war uncharakteristisch (breites Maximum bei 301 nm). Das UV-Spektrogramm könnte unter Umständen Piperazin zuzuordnen sein, das bei Lösung der Reinsubstanz in aqua dest. und dünnschichtchromatographischer Auftrennung im Laufmittel Methanol:Chloroform: Essigsäureäthylester = 1:2:1 u.a. (s. S. 46) eine schwache, evtl. erst nach einiger Zeit auftretende Absorption zeigte, die im UV-Spektrogramm (0,5 N H_2SO_4) ebenfalls ein breites Maximum bei

304 nm aufwies. Allerdings war die Absorption bei einem höheren Rf-Wert (0,76) zu finden und im UV-Licht (254 nm) als Absorption und nicht wie hier als Fluoreszenz erkennbar.

Fleck 3 zeigte eine dem Insidon entsprechende UV-Absorption. Sein Rf-Wert stimmte mit dem der mitgeführten Reinsubstanz des Insidons überein.

Abb. 6 gibt eine schematische Darstellung der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung des alkalischen und neutralen Extraktes aus Mageninhalt.

Für das Vorhandensein von Librium ergaben sich bei der papier- und dünn-schichtchromatographischen Untersuchung keine Anhaltspunkte.

Eine quantitative UV-spektrophotometrische Bestimmung der Insidonmenge im Mageninhalt brachte für das unveränderte Pharmakon einen Wert von 58,7 mg%. Bereits abgewandeltes Insidon wurde zu, insgesamt etwa 2,95 mg% gefunden, wovon 0,09 mg% als Iminostilben vorlagen. Die spektrophotometrisch ermittelten Extinktionswerte wurden an einer Insidon- bzw. Iminostilben-Eichkurve abgelesen. Diese waren hergestellt worden nach papierchromatographischer (Laufmittel N-Butanol, gesättigt mit 15%iger Ameisensäure nach JATZKEWITZ) bzw. dünn-schichtchromatographischer (Laufmittel Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester = 1:2:1) Trennung der in Äthanol gelösten Reinsubstanzen und Elution mit 0,5 N H_2SO_4 (Insidonfraktion) bzw. mit Acetonitril (Iminostilbenfraktion).

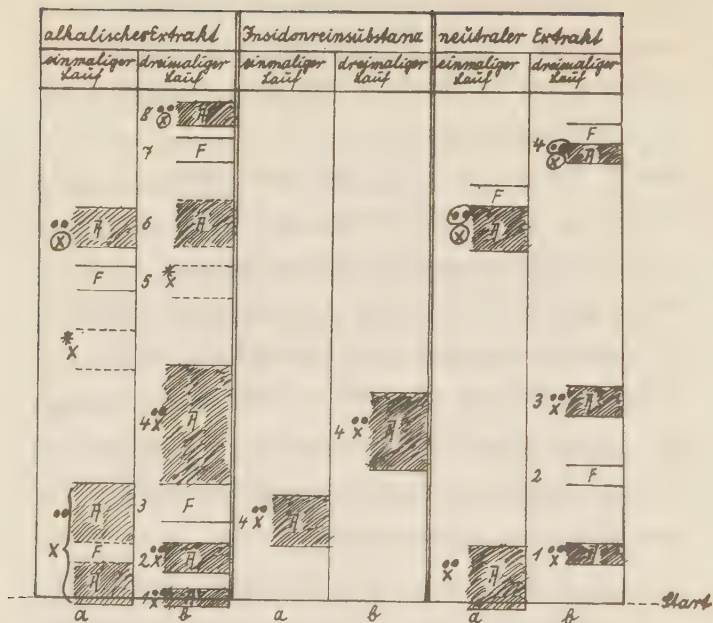


Abb. 6: Schematische Darstellung der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des alkalischen und neutralen Extraktes aus Kageninhal nach

a) einmaligem Lauf im Lösungsmittelgemisch Methanol: Chloroform:

Essigsäure: Ethylacetat (9:2:1)

b) dreimaligem Lauf im Lösungsmittelgemisch Methanol: Chloroform:

Essigsäure: Ethylacetat (9:2:1)

Plattenmaterial: Kieselgel HF 254 Merck

----- keine Absorption, $\overline{H}$ Absorption $\overline{F}$ Fluoreszenz
keine Fluoreszenz

X Dragendorffs Reagenz: orange

$\odot$ Dragendorffs Reagenz: braun

$\odot$ Hg NO_3 - gelb

$\odot$ Hg NO_3 - braun

$\ast$ Diazo-Reagenz: orange-gelb

b) Urin.

Die Reaktionen nach CRONHEIM-WARE auf basische Medikamente und nach FORREST auf Phenothiazine fielen deutlich positiv aus.

Die papier- und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Extrakte ergaben weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. Als Laufmittelgemisch erwies sich für die Dünnschichtchromatographie Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester (1:2:1) gegenüber Methanol:Chloroform = 1:2 + 2 Tropfen Triäthanolamin als vorteilhafter, da es neben einer kürzeren Laufzeit (3/4 Stunde) schon bei relativ niedrigen Konzentrationen sämtliche Flecken aufdeckt. Die Trennschärfe ist bei beiden Gemischen etwa gleichwertig.

b₁) saurer Extrakt

Bei der papierchromatographischen Auftrennung des sauren Extraktes im alkalischen Laufmittelgemisch konnte im Harn vom 29.9.1966 (16.00 Uhr) und im Harn vom 2.10.1966 bei Rf-Wert 0,89 (0,79-0,90) Iminostilben nachgewiesen werden. Bei dem genannten Rf-Wert fand sich im UV-Licht (254 nm) eine Absorption, zusammenhängend mit einer blauen Fluoreszenz, die sich mit Dragendorff's Reagenz braun, mit HgNO_3 und EHRlich-Reagenz gelb anfärbte. Im UV-Spektrogramm ergab sich die für Iminostilben kennzeichnende UV-Absorptionskurve, bei der eine Absorption auch oberhalb 330 nm noch vorhanden ist (Schindler und Blattner 1961).

Alle weiteren im normalen Harnextrakt nicht vorkommenden Fraktionen färbten sich mit HgNO_3 schwarz, einzelne zusätzlich mit Diazo-Reagenz rotbraun. Bei Rf-Wert 0,62 konnte UV-spektrographisch Barbiturat, bei Rf-Wert 0,20 eine dem Atarax ähnliche UV-Absorptionskurve nachgewiesen werden.

Bei dünnschichtchromatographischer Auftrennung des sauren Extraktes sahen wir bei Rf-Wert 0,87 (0,68-0,91) die sich in der üblichen Weise mit Dragendorff's Reagenz anfärbende Absorption, die das UV-Spektrum des Iminostilbens ergab. Beim sauren Harnextrakt vom 5.10.1966 trat stattdessen bei Rf-Wert 0,15 eine leuchtend weiße Fluoreszenz auf, die das vorgenannte UV-Spektrogramm aufwies.

Im Startbereich der sauren Harnextrakte aller Harnproben fanden sich drei übereinanderliegende, aber voneinander getrennte Fraktionen, die für das Vorhandensein des ungespaltenen Piperazinringes sprechen. Vorversuche hatten gezeigt, daß in Wasser gelöste und dünnschichtchromatographisch unter den gleichen Bedingungen entwickelte Piperazin-Reinsubstanz neben einer schwachen Absorption bei Rf-Wert 0,76 (vgl. S. 42) dieselbe Auftrennung in drei übereinanderliegende Absorptionen in Startnähe ergibt. Mit Dragendorff's Reagenz färbte sich die oberste Fraktion (Absorption bei $R_f = 0,28$) bei Piperazin und im sauren Harnextrakt schwach orange an, die beiden darunterliegenden Absorptionen dagegen gelb, wobei bei der Piperazin-Rein-

substanz und im sauren Extrakt unter Lichteinwirkung eine Farbvertiefung der am Start liegenden Absorption eintrat. Mit Phenolreagenz zeigte sich im Bereich der drei Absorptionen bei der Piperazin-Reinstsubstanz ein weißer Fleck auf gelbem Grund; im sauren Harnextrakt dagegen färbte sich die Absorption am Start rot, während die darüberliegenden beiden Absorptionen weiße Flecken wie bei der Piperazin-Reinstsubstanz aufwiesen. Von diesen drei in Startnähe befindlichen Fraktionen wurde die am schnellsten wandernde UV-spektrographisch untersucht. Sie zeigte im sauren Milieu ($0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$) ein Maximum bei 253 nm , im alkalischen (NaOH) bei 248 nm , wobei die Maxima nur schwach ausgebildet waren. Die in $0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ gelöste Piperazin-Reinstsubstanz gab im UV-Spektrogramm ein deutliches Maximum bei $320/321 \text{ nm}$, das bei Alkalisierung mit conc. NaOH verschwand. Bei weiterer Verdünnung der in $0,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ gelösten Piperazin-Reinstsubstanz konnte das Maximum bei 320 nm schließlich nicht mehr festgestellt werden, dafür trat andeutungsweise bei 252 nm und im alkalischen Milieu (Alkalisierung mit conc. NaOH) bei 249 nm ein Maximum auf.

Bei Anfertigung eines sauren, alkalischen und neutralen Extraktes von in aqua dest. gelöster Piperazin-Reinstsubstanz in üblicher Weise und dünnschichtchromatographischer Auftrennung auf Kieselgel HF-Platten Merck im Laufmittel Methanol:Chloroform:Essigsäure-

Äthylester = 1:2:1 erschien die Absorption mit Rf-Wert 0,76 im neutralen Extrakt; die anderen, bereits vorher bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von in aqua dest. gelöster Piperazin-Rein-substanz beschriebenen übereinanderliegenden Absorptionen fanden sich in derselben Anordnung wie dort bei Rf-Werten von 0,31 und 0,26 und schwacher Startabsorption. Die Anfärbbarkeit mit Dragendorff's Reagenz entsprach ebenfalls der dort beschriebenen.

Gnehm, Reich und Guyer (1965) geben für Piperazin auf Kieselgel G-Platten und im Laufmittelgemisch Chloroform:Methanol:17%igem Ammoniakwasser = 2:2:1 einen Rf-Wert von 0,21 an. Die Rf-Werte weiterer Piperazinderivate und cis/trans-isomerer Piperazinverbindungen sind in dieser Arbeit ebenfalls angegeben. An das Auftreten einer cis/trans-Isomerie von Piperazinderivaten muß beim Metabolismus des Insidons, besonders der Seitenkette mit dem Piperazining, ebenfalls gedacht werden, u.U. handelt es sich bei der Absorption mit Rf-Wert 0,76 um eine trans-Verbindung.

b₂) alkalischer Extrakt

Die papierchromatographische Untersuchung des alkalischen Extraktes im sauren Laufmittelgemisch ergab bei allen vier Harnproben bei Rf-Wert 0,59 (0,55-0,62) nach Anfärbbarkeit und UV-Absorptionskurve die mit Insidon identische Fraktion. Mitun-

ter traten bei $R_f = 0,74$ (0,61-0,74) und bei $R_f = 0,89$ (0,76-0,89) zwei mehr oder weniger gut abgrenzbare bläulich-rosa fluoreszierende Flecken auf, die sich mit Dragendorff's Reagenz schwach orange anfärbten. Die UV-Spektren zeigten eine gewisse Ähnlichkeit mit denen des Iminostilbens. Die Maxima-verschiebung zwischen saurem Milieu (253 nm) und alkalischem Milieu (247 nm) waren wie bei Iminostilben vorhanden. Das für Iminostilben sehr typische kleine Maximum bei 352 nm fehlte, unter Umständen aber infolge der sehr niedrigen Konzentration. Die UV-Spektrogramme wiesen, abgesehen von dem dem Iminostilben entsprechenden engen Maximumbereich, wie bei der Insidon-Absorptionskurve eine breitere Basis auf (vgl. Abb. 2 und 4 a). Die rosa-bläulichen Fluoreszenzen kommen auch im alkalischen Extrakt des Leerharns vor, zeigen hier aber keine Anfärbbarkeit mit Dragendorff's Reagenz. Auch bei $R_f = 0,40$ war verschiedentlich eine blau-weiße bzw. blau-rosa Fluoreszenz zu beobachten, deren UV-Kurve große Ähnlichkeit mit der des Insidons aufwies. Mit Dragendorff's Reagenz färbte sich die Fluoreszenz nur ganz schwach orange an. Die bei Chromatographie alkalischer bzw. neutraler Leerharnextrakte in diesem R_f -Bereich (0,37-0,47) auftretende Fraktion war im UV-Licht (254 nm) als Absorption erkennbar und gab mit Dragendorff's Reagenz keine, mit Diazo-Reagenz

jedoch eine Gelbfärbung. Die UV-Absorptionskurve wies hier im sauren Milieu ein Maximum bei 267 nm, im alkalischen Milieu eines bei 271 nm auf.

Dünnschichtchromatographisch konnten im alkalischen Extrakt acht Flecken unterschieden werden. Eine bessere Abtrennung der Fraktionen voneinander, besonders der in Startnähe liegenden, erreichten wir durch die Mehrfach-Dünnschichtchromatographie. Im UV-Licht (254 nm) erschienen die Flecke 0, 1, 3, 5 und 6 als Absorptionen, Fleck 2 als Fluoreszenz und Fleck 7 als Absorption, die meist ringförmig von einer weißen Fluoreszenz umgeben war. Rf-Werte und Anfärbbarkeit der einzelnen Fraktionen mit gleichzeitiger Metabolitenbezeichnung können aus Tab. 6 ersehen werden.

Eine Gesamtzusammenstellung der im sauren, alkalischen und neutralen Harnextrakt vorkommenden und dünn-schichtchromatographisch ermittelten Metaboliten mit Angabe der entsprechenden Rf-Werte ist in Tab. 8 auf S. 64 zu finden.

Fleck	Metabolit	UV-Licht 254 nm	Rf-Wert	Dragendorff-Reagenz	Diazo-Reagenz	Phenol-Reagenz	Färbung unter Lichteinwirkung
0	I	A	0,03	orange	hellbraun	---	gelb
1	II	A	0,08	orange	rotbraun	---	gelb-rosa
2	III	F	0,12	---	gelb-orange	---	gelb-rosa
3	Insidonfraktion	A	0,18	orange	hellgelb	---	gelb
4	IV	A	0,42	---	---	---	---
5	V	A	0,59	orange	gelb-rosa	---	---
6	VI	A	0,78	orange	gelb-rosa	---	gelb
7	VIIa	A + F	0,85	A = braun F = ---	---	---	A = rosa F = gelb

Tab. 6: Rf-Werte und Anfärbbarkeit der Fraktionen im alkalischen Harnextrakt

A = Absorption

F = Fluoreszenz

Die UV-Spektren der Eluate bei $R_f = 0,03$ (Metabolit I) und $0,18$ (Insidonfraktion) zeigten mit dem des Insidons vollständige Übereinstimmung, während diejenigen bei $R_f = 0,08$ (Metabolit II) und $0,12$ (Metabolit III) nicht als völlig identisch angesehen werden konnten. Bei der UV-Absorptionskurve von Metabolit II fand sich im sauren Milieu zusätzlich bei 225 nm ein Maximum und bei 222 nm ein Minimum, was neben der rot-braunen Färbung mit Diazo-Reagenz für das gleichzeitige Vorhandensein von Atarax bzw. eines nahe verwandten Abbauproduktes spricht. Das Maximum bei 225 nm fehlte bei Metabolit III. Stattdessen zeigte sich von 241 nm zu 222 nm , wo sich bei Metabolit II jeweils ein Maximum befand, ein völlig geradliniger Anstieg, was dem UV-Spektrum ein charakteristisches Aussehen verleiht.

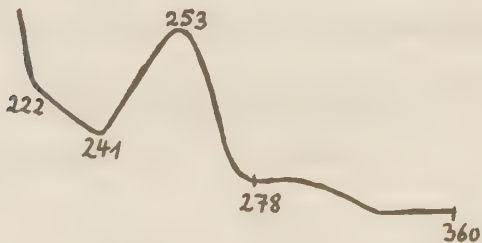


Abb. 7: UV-Spektrogramm von Metabolit III des alkalischen Harnextraktes.

Bei den UV-Absorptionskurven von Metabolit IV und V ergab sich eine große Ähnlichkeit mit dem an der alkoholischen OH-Gruppe der Seitenkette acetylierten Insidon (siehe Diskussion).

Die oberste Fraktion (Metabolit VII a) ist entweder vollständig identisch mit Iminostilben (gleiches UV-Spektrogramm und gleicher Rf-Wert wie die Reinsubstanz) oder es ist zu einer geringgradigen Veränderung im Molekül gekommen, wodurch dieses schwach basisch geworden ist. Bei der bei $R_f = 0,42$ auftretenden Absorption ist es nicht sicher, ob es sich um ein Stoffwechselprodukt des Insidons, oder eine auch im normalen Harn vorkommende, im Vergiftungsfall unter Umständen verstärkt auftretende Fraktion handelt. Im sauren Milieu zeigen die beiden entsprechenden Fraktionen der alkalischen Extrakte von Leerharn und Harn nach Insidoneinnahme bei 266 nm jeweils ein Maximum, im alkalischen Milieu haben wir dagegen nur bei der des Leerharns eine Maximumverschiebung nach 271 nm. Diese fehlende Verschiebung läßt wieder an ein Stoffwechselprodukt des Insidons denken.

b3) neutraler Extrakt

Aus dem neutralen Extrakt trennten sich papierchromatographisch im sauren Laufmittelgemisch zwei zum Insidonstoffwechsel gehörende Fraktionen: bei $R_f = 0,57$ die mit der Reinsubstanz Insidon identische gelbe Fluoreszenz und bei $R_f = 0,84$ eine braune Absorption mit darunterliegender roter Fluoreszenz. Aus letzterer entstand beim Harn vom 29.9.1966 (16.00 Uhr) mit Dragendorff's Reagenz ein violett-brauner, beim Harn vom 2.10.1966 ein rot-brauner, mit

Diazo-Reagenz ein stark bzw. schwach violetter Farbfleck. Die Absorption färbte sich beim Harn vom 29.9.1966 (16.00 Uhr) mit Dragendorff's Reagenz braun, beim Harn vom 2.10.1966 violett-braun; nur beim Harn vom 2.10.1966 entstand zwischen Absorption und Fluoreszenz mit Diazo-Reagenz eine rote, mit EHRlich-Reagenz eine kräftig gelbe Anfärbung. Im UV-Bereich ergab diese Fraktion eine auf Iminostilben hinweisende UV-Absorptionskurve. Wir haben hier aber eine Maximumverschiebung zum langwelligen UV-Bereich hin (Maximum im sauren Milieu 261 nm); im alkalischen Milieu ergibt sich durch die Zweigipfligkeit (ausgeprägtes Maximum bei 258 nm, kleines Maximum bei 240 nm) eine Ähnlichkeit mit dem UV-Spektrum von Librium, auf die auch schon Drabner (1966) hinwies. Aus dem Harn vom 29.9.1966 (16.00 Uhr) konnte dieses UV-Spektrogramm nicht erstellt werden. Dafür fand sich hier bei Rf-Wert 0,33 eine Absorption, die sich mit Dragendorff's Reagenz orange anfärbte und ein mit Iminostilben übereinstimmendes UV-Spektrogramm ergab. Unter diesem Rf-Wert fanden wir im neutralen Extrakt des Harns vom 5.10.1966 ebenfalls diese Iminostilbenfraktion. Das UV-Spektrogramm bei Rf = 0,86 (Harn vom 29.9.1966 - 16.00 Uhr) zeigte eine große Ähnlichkeit zu Insidon. Es tritt hierbei aber eine Maximumverschiebung zum langwelligeren UV-Bereich ein (Maximum im sauren und alkalischen Milieu 262 nm, wobei das Maximum im alkalischen Milieu nur schwach ausgeprägt

ist). Es könnte sich hierbei um einen Metaboliten des Insidons handeln, da ein im neutralen Extrakt des Leerharns unter diesem Rf-Wert auftretender Fleck im UV-Licht als blaue Fluoreszenz erscheint und auch eine andere UV-Absorptionskurve aufweist.

Dünnschichtchromatographisch konnten im neutralen Extrakt 6 bis 7 Fraktionen getrennt werden, von denen aber nur zwei bis drei als Stoffwechselprodukte des Insidons angesehen werden können. Fleck 1 ($R_f = 0,06$), mit Dragendorff's Reagenz orange anfärbbar, wird unter Lichteinwirkung gelb und gibt eine mit Insidon übereinstimmende UV-Absorptionskurve. Bei Fleck 3 ($R_f = 0,34-0,40$) fand sich wieder die Fraktion, die mit Dragendorff's Reagenz keine Reaktion zeigt und im UV-Spektrogramm sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu ein Maximum bei 267/268 nm aufweist. Im Harn vom 5.10.1966 konnte diese Absorption nicht mehr festgestellt werden. Bezüglich der folgenden Fraktionen verhielten sich die neutralen Harnextrakte vom 29.9.1966 (16.00 Uhr), vom 2.10. und 5.10.1966 unterschiedlich. Fleck 2 ($R_f = 0,13-0,24$) des Harns vom 5.10.1966 und 29.9.1966 (16.00 Uhr) zeigte im UV-Licht (254 nm) eine mit einer Fluoreszenz gekoppelte Absorption; nur die Absorption färbte sich mit Dragendorff's Reagenz orangebraun und wurde unter Lichteinwirkung rosa, die Fluoreszenz dagegen gelb. Die UV-Absorptionskurve entsprach vollständig der des Iminostilbens. Wir bezeichnen die-

se Fraktion als Metabolit VIII. Im Harn vom 2.10.1966 fand sich unter Rf-Wert 0,13-0,24 nur eine Absorption, die unter Lichteinwirkung zwar gelb wurde, im UV-Spektrogramm aber nicht einzuordnen war (Maximum im sauren Milieu bei 263 nm, im alkalischen Milieu keine UV-Absorptionskurve). Im Harn vom 2.10.1966 färbte sich die Absorption bei Rf = 0,76 (Metabolit IX) mit Dragendorff's Reagenz schwach orange an ; mit Phenolreagenz und unter Lichteinwirkung wurde sie rot. Bei der spektralphotometrischen Messung ergab sich im sauren Milieu eine dem Iminostilben verwandte UV-Absorptionskurve mit einer Maximumverschiebung nach 265 nm. Im alkalischen Milieu entstand eine zweigipflige UV-Absorptionskurve mit einem Hauptmaximum bei 268 nm und einem kleinen Maximum bei 238 nm. Auf das Vorkommen dieser Erscheinung und die Ähnlichkeit mit dem UV-Spektrum des Libriums wurde bereits auf Seite 54 hingewiesen. Im Harn vom 29.9.1966 (16.00 Uhr) konnte unter diesem Rf-Wert keine entsprechende UV-Absorptionskurve nachgewiesen werden. Zwischen Fleck 1 und Fleck 2 trennte sich mit der Mehrfach-Dünnschichtchromatographie eine absorbierende Fraktion ab, bei der es sich nach dem Ergebnis der UV-spektrographischen Untersuchung um Atarax handelte.

Da wir annehmen, daß die Flecke 1 und 3 infolge ihres Rf-Wertes, ihrer Anfärbbarkeit bzw. Fehlens einer Anfärbbarkeit mit Dragendorff's Reagenz und ihres UV-

Absorptionsspektrums den Metaboliten I und IV des alkalischen Extraktes zuzuordnen sind, dies IR-spektrophotometrisch bisher aber nicht nachgewiesen werden konnte, bezeichnen wir Fleck 1 als Metabolit I a und Fleck 3 als Metabolit IV a.

Die übrigen Fraktionen des neutralen Extraktes, die sich zum Teil unter Lichteinwirkung intensiv rot- bzw. blau-violett färbten, ergaben keine oder nur uncharakteristische UV-Spektren. Unter ihren Rf-Werten kommen auch im Leerharn Absorptionen vor, die aber unter Lichteinwirkung keine oder nur eine leichte Gelbfärbung zeigen. Bei diesen intensiv violett werdenden Fraktionen handelt es sich wahrscheinlich um vermehrt ausgeschiedenen Harnstoff, aus dem sich Biuret gebildet hat (pH des Harns vom 29.9.1966 - 16.00 Uhr und vom 2.10.1966 = 8,5; Geruch nach Ammoniak). Der Harn vom 5.10.1966 wies ein pH von 5,5 auf; hier traten diese auffallenden Färbungen nicht mehr auf. Die Fraktionen, die mit Phenolreagenz und unter Lichteinwirkung kräftig rot wurden, liegen fast ausschließlich im sauren Extrakt, färben sich größtenteils mit HgNO_3 schwarz an und dürften Abbauprodukte von Barbituraten sein. Im neutralen Extrakt fand sich eine entsprechende Fraktion (Metabolit IX) nur unter $R_f = 0,79$, dem R_f -Wert des Iminostilbens, welches mit Phenolreagenz aber keine Rotfärbung zeigte.

Eine Übersicht über die dünnschichtchromatographische

Auftrennung des sauren, alkalischen und neutralen Extraktes in Gegenüberstellung zum Leerharn zeigt Abb. 8.

Für eine quantitative spektrophotometrische Auswertung wurden eine Insidon- sowie eine Iminostilben-Eichkurve zu Grunde gelegt:

Reinsubstanz wurde Leerharn zugesetzt; danach folgten dreimalige Chloroformextraktion aus soda-alkalischer Lösung bei Insidon bzw. dreimalige Ätherextraktion aus weinsaurer Lösung bei Iminostilben, dünnschichtchromatographische Trennung (Laufmittel: Methanol:Chloroform: Essigsäureäthylester = 1:2:1) und Elution mit 0,5 N H_2SO_4 (Insidonfraktion) bzw. Acetonitril (Iminostilbenfraktion).

Im Harn vom 29.9. und 2.10.1966 konnte Metabolit I als Hauptmetabolit festgestellt werden. Sie macht beim Harn vom 29.9.1966 (16.00 Uhr) und 2.10.1966 etwa 2/3 der Gesamtmetaboliten (Iminostilben und Iminostilbenverwandte Substanzen eingerechnet) aus.

Insidon und seine Stoffwechselprodukte konnten bereits zwei Stunden nach Tablettenaufnahme und noch am 7. Ausscheidungstag wahrgenommen werden. Im Harn vom 5.10.66 stellte die dem Iminostilben verwandte Verbindung (Metabolit VIII) gegenüber Metabolit I die stärkere Fraktion dar, die im neutralen Extrakt bei Rf-Wert 0,13-0,24 zu finden war. Wegen des niedrigen Rf-Wertes kann sie aber trotz Übereinstimmung der UV-Absorptionskur-

Leerharn		Referenzsubstanz		Rarr nach Insidomaufnahme	
saurer Extrakt	alkalischer/neutraler Extrakt	Insidon	Imino-süßen	saurer Extrakt	alkalischer/neutraler Extrakt
0,88	0,85		0,85	0,85	0,87
				0,76	0,78
				0,61	0,59
	0,54			0,45	0,45
0,39	0,37			0,16	0,16
				0,12	0,12
				0,10	0,10
				0,08	0,08
				0,03	0,03

Abb. 8: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der sauren, alkalischen und neutralen Extrakte von Leerharn und insidomaltigem Rarr.

F = Absorption

Fw = weiße Fluoreszenz

Fbl = blaue Fluoreszenz

x = Trägersubstanz mit Dragendorffs Reagenz

xx = Bräunfärbung mit Dragendorffs Reagenz

• = Aufarbeitung

• = Verdünnung unter Lichtwirkung

○ = keine Pigmentierung

○ = keine Absorption

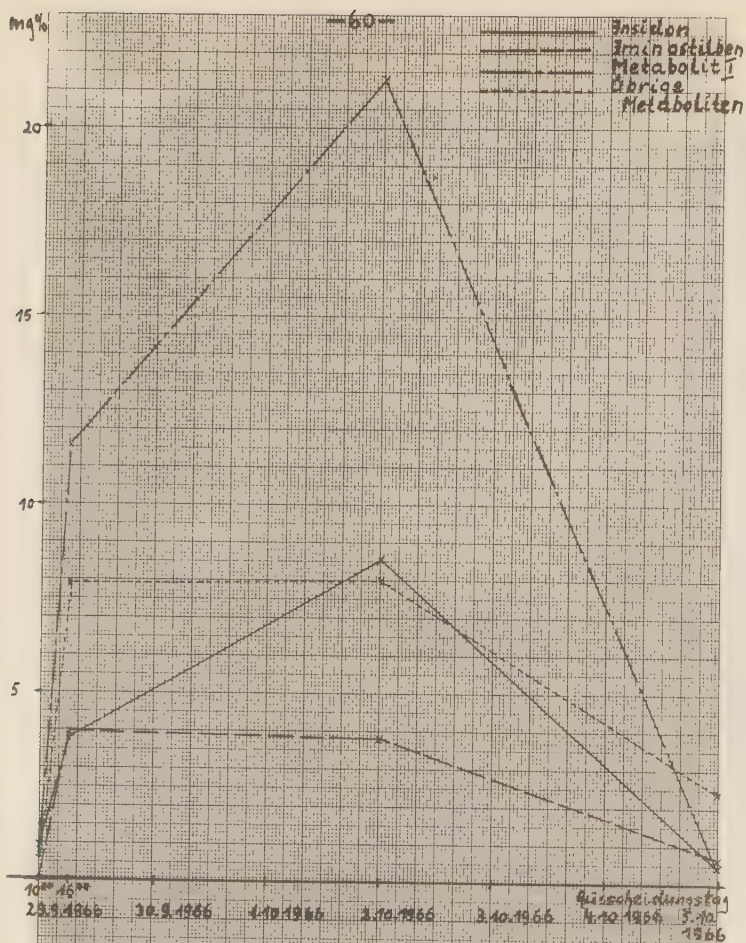


Diagramm 1.

Ausscheidungswerte des Insidons und seiner Metaboliten an den verschiedenen Ausscheidungstagen (Giftaufnahme: 23.9.1966, 9⁰⁰ Uhr)

ven nicht als identisch mit Iminostilben angesehen werden.

In Tab. 7 sind die Ausscheidungswerte von Insidon, Metabolit I, Iminostilben (Metabolit VII und VII a) und den übrigen Metaboliten an den verschiedenen Tagen zusammengestellt, die in Diagramm 1 wiedergegeben sind. Dem Iminostilben zugerechnet sind auch die im neutralen Extrakt aufgefundenen Fraktionen bei $R_f = 0,13-0,24$ (Metabolit VIII) (Harn vom 29.9.1966 - 16.00 Uhr und 5.10.1966) und $R_f = 0,79$ (Metabolit IX) (Harn vom 2.10.1966), die nur als Iminostilben-verwandte Substanzen angesehen werden können.

	Harn vom 29.9.1966 10.00 Uhr	Harn vom 29.9.1966 16.00 Uhr	Harn vom 2.10.1966	Harn vom 5.10.1966
Insidon	0,97	3,8	8,53	0,46
Iminostilben	0,05	3,94	3,81	0,65
Metabolit I	0,76	11,66	21,32	0,44
Übrige Metaboliten	0,63	7,92	7,99	2,4

Tab. 7: Ausscheidungswerte von Insidon und Insidon-Metaboliten in mg%.

Zur Erfassung konjugierter Metaboliten wurde der Harn vom 2.10.1966 einer einstündigen sauren Hydrolyse (20 ml Harn und 50 ml rauchende HCl) unterworfen, nachdem der sodaalkalische Harn zuvor einer aus-

giebigen 330stündigen Ätherextraktion im Kutscher-Steudel-Apparat bei insgesamt viermaliger Erneuerung des Extraktionsmittels ausgesetzt worden war. Hierbei konnte unverändertes Insidon völlig entfernt werden. Selbst nach der extrem langen Extraktionszeit war es aber nicht gelungen, den Harn frei von extrahierbaren Metaboliten zu bekommen. Besonders Metabolit I im alkalischen Harnextrakt und Metabolit I a im neutralen Extrakt und auch der Iminostilben-verwandte Metabolit IX zeigte noch eine relativ starke Absorption. Die konjugierten Metaboliten mußten daher aus der Differenz der Untersuchungsergebnisse im sauren, alkalischen und neutralen Extrakt vor und nach Hydrolyse ermittelt werden.

Nach Hydrolyse fand sich im alkalischen Extrakt eine stärkere, mit Dragendorff's Reagenz anfärbbare Fraktion am Start, die die UV-Absorptionskurve des Insidons aufwies. Dagegen hatte bei Metabolit I die Anfärbbbarkeit mit Dragendorff's Reagenz deutlich nachgelassen. Im neutralen Extrakt wurde ein entsprechendes Bild gefunden. Bei der Konzentrationsermittlung ergab sich dementsprechend für die Start-Absorption des alkalischen Extraktes nach Hydrolyse eine Zunahme um nicht ganz die Hälfte des vor Hydrolyse ermittelten Wertes (vor Hydrolyse 1,25 mg%, nach Hydrolyse 2,23 mg%), für Metabolit I eine erhebliche Abnahme der Konzentration (vor Hydrolyse 4,8 mg%, nach Hydro-

lyse 1,67 mg%). Insgesamt trat dabei durch die Hydrolyse ein Verlust von 2,15 mg% (etwa ein Drittel) ein.

Für die übrigen Fraktionen ermittelten wir nach Hydrolyse eine Zunahme von etwa einem Achtel der vorher im Harnextrakt gefundenen Metaboliten. Der Iminostilben-ähnliche Metabolit IX, der vor Hydrolyse 0,25 mg% betragen hatte, war nach Hydrolyse nicht mehr aufzufinden. Dafür erschien neu im sauren Extrakt unter Rf-Wert 0,71 (dünn-schichtchromatographische Auftrennung auf Kieselgel HF-Platten Merck im Laufmittel Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester = 1:2:1) eine im UV-Licht (254 nm) braun-grüne Absorption, die mit Phenol- und Dragendorff's Reagenz nur eine Braunfärbung zeigte. Wir bezeichnen diese Fraktion als Metabolit X. Das UV-Spektrogramm ergab eine Absorptionskurve mit einem Maximum im sauren Milieu bei 260 nm, im alkalischen Milieu bei 264 nm. Die Konzentration dieses Metaboliten betrug 0,85 mg%.

Librium bzw. 2-Amino-5-chlorbenzophenon waren nach Säumler und Rippstein nicht nachweisbar.

Nachfolgende Tabelle 8 gibt eine Zusammenstellung aller Metaboliten des Insidons, die wir bei der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der sauren, alkalischen und neutralen Harnextrakte und nach Hydrolyse ermitteln konnten.

Extrakt	Metabolit	Rf-Wert	UV-Licht 254 nm	Vorkommen bzw. Zuordnung
saurer Extrakt		Start	A	wahrscheinlich Piperazin bzw. Piperazin- derivat
		0,21	A	
		0,28	A	
	XI	0,15	F weiß	nur im Harn vom 5.10.1966 vorhan- den
	X	0,67	A grün	nur nach Hydrolyse - Iminostilbenderivat
	VII	0,79- 0,90	A + F	Iminostilben
alkali- soher Extrakt	I	0,03	A	Insidon (freie Base)
	II	0,08	A	
	III	0,12	F	
	Insidon- fraktion	0,18	A	Metabolit oder Harnsubstanz
	IV	0,42	A	
	V	0,59	A	
	VI	0,78	A	Iminostilben oder Iminostilbenderivat
	VII a	0,85	A + F	
neutra- ler Extrakt	VIII	0,13- 0,24	A	Iminostilbenderivat
	IX	0,76- 0,87	A	Iminostilbenderivat

Tab. 8: Zusammenstellung der dünnschichtchromatographisch (Kieselgel HF-Platten Merck; Laufmittelgemisch Methanol:Chloroform;Essigsäureäthylester = 1:2:1) aus sauren, alkalischen und neutralen Harnextrakten aufgetrennten Metaboliten des Insidons.

A = Absorption F = Fluoreszenz

In diesem Zusammenhang möchten wir noch auf eine bemerkenswerte Beobachtung hinweisen:

Wir setzten in aqua dest. gelöster Insidon-Rein-
substanz (Geigy), von der wir einen Teil auf einen
pH-Wert von 7,6, den anderen auf einen pH-Wert von
3,4 brachten, KMnO_4 zu und stellten nach 3 Tagen
jeweils einen sodaalkalischen Chloroformextrakt
(nach vorheriger weinsaurer Ätherextraktion) her
und trennten beide Extrakte dünnschichtchromato-
graphisch auf Kieselgel HF-Platten Merck im Lauf-
mittelgemisch Methanol:Chloroform:Essigsäureäthyl-
ester (1:2:1) auf. Es ergab sich dasselbe Metaboli-
tenmuster wie wir es aus alkalischen Harnextrakten
gewonnen hatten mit folgenden Rf-Werten: 0 (Start-
absorption), 0,11 (Absorption), 0,20 (Fluoreszenz),
0,35 (Absorption = Insidonfraktion), 0,59 (Absorp-
tion), 0,73 (Fluoreszenz) und 0,80 (grüne Absorp-
tion und weiße Fluoreszenz = Iminostilbenfraktion).
Nur die Fraktion bei Rf-Wert 0,73 erschien hier als
Fluoreszenz, im Harnextrakt als Absorption. Sie
färbte sich mit Dragendorff's Reagenz nicht, wäh-
rend alle anderen Fraktionen eine entsprechende An-
färbbarkeit zeigten.

Eine mit Metabolit IV vergleichbare Absorption zwi-
schen $R_f = 0,35$ und $R_f = 0,59$ konnte nicht ermit-
telt werden.

Die UV-Absorptionsspektren erwiesen sich denen der

entsprechenden Fraktionen des alkalischen Harnextraktes als sehr ähnlich bzw. als identisch mit diesen (Insidon- und Iminostilbenfraktion).

4.) Physikalische Untersuchungen.

a) Schmelzpunktbestimmung.

Die nach dünnschichtchromatographischer Trennung auf Kieselgel HF-Platten Merck im Laufmittel Methanol:Chloroform: Essigsäureäthylester (1:2:1) durch Elution in vorgenannter Weise (s. S. 41) aus dem alkalischen Harnextrakt und aus der in aqua dest. gelösten Insidon-Reinsubstanz (Geigy) gewonnenen Insidonfraktionen ergaben in beiden Fällen einen Schmelzpunkt von $95-100^{\circ}$, wie er von Schindler (1962) für die freie Base angegeben worden ist, während der von uns ermittelte und von der Firma Geigy (Prospekt) angegebene Schmelzpunkt der Insidon-Reinsubstanz (Geigy) bei 212° liegt, bei der es sich um das Salz handelt. Bei 212° tritt gleichzeitig Zersetzung ein.

Für die Insidonfraktion der Reinsubstanz stellten wir einen Zersetzungspunkt von ebenfalls $212^{\circ}-215^{\circ}$ fest; bei der Insidonfraktion des alkalischen Harnextraktes liegt der Zersetzungspunkt niedriger, und zwar bei $150^{\circ}-155^{\circ}$. Ein von uns aus Insidon-Reinsubstanz (Geigy) nach vorheriger weinsaurer Ätherextraktion bei pH 9,0 hergestellter sodaalkalischer Chloroformextrakt, der mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und auf dem Wasserbad eingedampft worden war, ergab ebenfalls einen Schmelzpunkt von $95^{\circ}-98^{\circ}$. Der Zersetzungspunkt lag hier bei etwa 227° .

Für Metabolit I, in gleicher Weise aus dem alkalischen Harnextrakt gewonnen wie die Insidonfraktionen (s. S. 66), ermittelten wir einen Schmelzpunkt von 158° - 160° ; Zersetzung trat bei etwa 212° - 215° ein.

Die Schmelzpunktbestimmungen wurden mit dem Kofler Heizblock durchgeführt.

b) Kristallstrukturelle Untersuchungen.

Die Kristallstruktur der Insidon-Reinsubstanz (Geigy) und seines natronalkalischen Chloroformextraktes wurde mit Hilfe von Röntgenstrahlen untersucht. Bei der Auswertung der Röntgenbilder konnte einwandfrei festgestellt werden, daß die beiden Substanzen nicht miteinander identisch sind.

5.) IR-spektrophotometrische Untersuchungen.

IR-Spektrogramme (KBr-Preßlinge) wurden nach präparativer dünnschichtchromatographischer Auftrennung der sauren, alkalischen und neutralen Harnextrakte von den Metaboliten I, II, III, IV, V, VI, VII und VII a, VIII, IX und der Insidonfraktion aufgenommen. Nur von Metabolit I und der Insidonfraktion konnte genügend Substanz gewonnen werden, um ein auswertbares IR-Spektrogramm zu erhalten. Insidon und seine Metaboliten werden von Kieselgel stark absorbiert und lassen sich mit wenig polaren Lösungsmitteln nur sehr schlecht eluieren. Bei Verwendung von polarerer Lösungsmitteln (wir verwandten Methanol) gelangt zu viel Kieselgel in das Eluat, so daß die IR-Spektren der übrigen

Metaboliten infolge ihrer geringeren Konzentration davon überdeckt wurden.

a) Insidonfraktion

Das zur Identifizierung der Fraktion, die in gleicher Höhe wie die Insidonvergleichssubstanz lag (Insidonfraktion), angefertigte IR-Spektrum (Abb. 10) zeigte große Unterschiede zu dem der Insidon-Reinsubstanz von Geigy (Abb. 9). Da hier bei $2400-2700\text{ cm}^{-1}$ mehrere breite Banden erschienen, obwohl im Molekül keine $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}=\text{N}^+$ -Gruppen vorlagen, wurde die Insidon-Reinsubstanz (Geigy) aus alkalischer (sodaalkalischer, natronalkalischer; jeweils bei einem pH-Wert von 10,5 und 7,9) Lösung in ein unpolares Lösungsmittel (CHCl_3) übergeführt. Das erhaltene IR-Spektrum war jetzt identisch mit demjenigen, das von der aus dem alkalischen Harnextrakt isolierten Substanz erstellt worden war. Gleichfalls als damit übereinstimmend erwies sich das IR-Spektrum der Insidonfraktion, die nach ebenfalls präparativer dünnschichtchromatographischer Aufarbeitung der in aqua dest. gelösten Insidon-Reinsubstanz (Geigy) hergestellt worden war. Aus diesen Ergebnissen zu schließen, lag die Insidon-Reinsubstanz (Geigy) nicht als freie Base, sondern in Form eines Salzes vor, wofür auch der von uns ermittelte Schmelzpunkt von 212° (s. S. 7) spricht. Es ist möglich, daß bereits durch Lösung der Reinsubstanz in aqua dest. die freie Base entsteht (der pH-Wert der wässrigen Lösung liegt bei 4,5).

b) Metabolit I

Das IR-Spektrogramm des Metaboliten I (Abb. 11) zeigt so weitgehende Ähnlichkeit mit der auf die gleiche Weise aus dem Harn isolierten unveränderten Insidonfraktion, daß keine wesentlichen Veränderungen am Gerüst des Insidon-Moleküls eingetreten sein können. Für eine weitere Identifizierung reichte das Material nicht aus.

Abb. 12 bringt zum Vergleich das IR-Spektrogramm von Iminostilben.

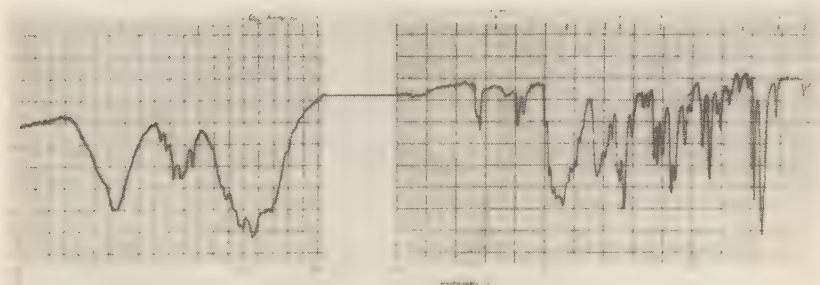


Abb. 9: IR-Spektrogramm von Insidon-Reinsubstanz (Geigy) (KBr-Preßling)

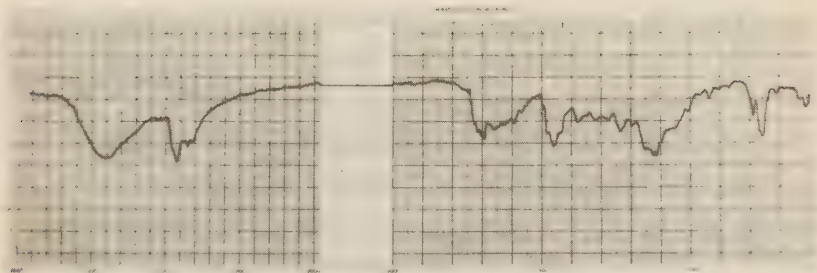


Abb. 10: IR-Spektrogramm der dünnstschichtchromatographisch aus dem alkalischen Harnextrakt getrennten Insidonfraktion (KBr-Preßling)

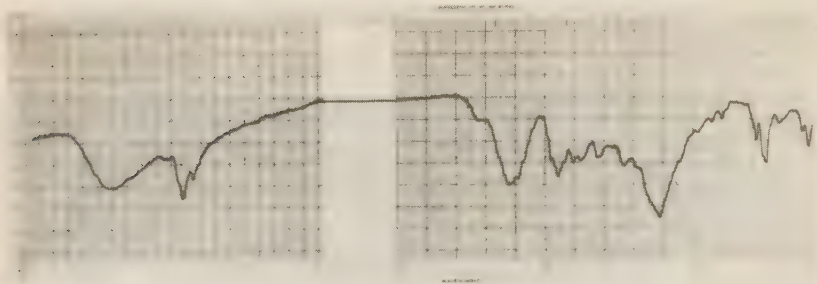


Abb. 11: IR-Spektrogramm des dünnstschichtchromatographisch aus dem alkalischen Harnextrakt getrennten Metaboliten I (KBr-Preßling)

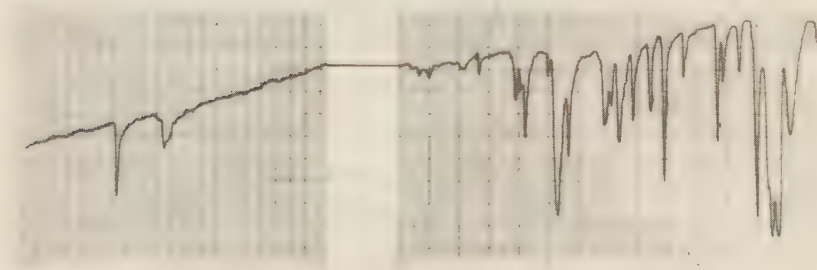


Abb. 12: IR-Spektrogramm von Iminostilben-Reinsubstanz (KBr-Preßling)

X. Diskussion.

=====

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß Insidon nach peroraler Aufnahme mit großer Geschwindigkeit abgebaut wird. Schon im Mageninhalt fand sich neben unverändertem Insidon eine geringe Menge von Zersetzungsprodukten, darunter Iminostilben.

Mit Hilfe der dünnschichtchromatographischen Methode konnten im Harn neben unverändertem Insidon, das IR-spektrophotometrisch nachgewiesen wurde (Abb. 10), zahlreiche Stoffwechselprodukte aufgedeckt werden, die aus Iminostilben sowie Iminostilben- und Insidon-verwandten Substanzen bestehen. An unverändertem Insidon wird nur ein relativ kleiner Betrag ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgt, nach IR-Spektrogramm und Schmelzpunkt zu schließen, als freie Base.

Als Hauptfraktion wurde bei unseren Untersuchungen Metabolit I erkannt, der im alkalischen Extrakt erscheint und dasselbe UV-Spektrogramm wie das unveränderte Insidon aufweist. Auffallend ist der sehr niedrige Rf-Wert in dem System Kieselgel HF₂₅₄ Merck und Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester = 1:2:1 als Laufmittelgemisch. Bei der im alkalischen Extrakt auftretenden Absorption, die sich mit Dragendorff's Reagenz nicht anfärbte, im sauren und alkalischen milieu gleiche UV-Absorptionsmaxima bei 261/262 nm aufwies, kann es sich gleichfalls um ein Stoffwechselprodukt des Insidons handeln (Metabolit IV). Diese Fraktion war nach der ausgiebigen Extraktion im Kutscher-Steudel-Apparat weder vor noch nach Hydrolyse nachweisbar. Metabolit V und VI (Rf-Wert 0,59 und

0,78) des alkalischen Harnextraktes wiesen UV-spektrographisch große Ähnlichkeit mit einem selbst hergestellten, an der alkoholischen OH-Gruppe der Seitenkette acetylierten Insidon auf. Das Acetylierungsprodukt zeigte zudem denselben Rf-Wert wie Metabolit V.

Daneben fand sich im sauren Extrakt eine Verbindung, die aufgrund ihrer Eigenschaften als Iminostilben (Metabolit VII) angesehen werden muß. Ob es sich bei der im alkalischen Extrakt unter demselben Rf-Wert erscheinenden Fraktion um Iminostilben oder nur um eine Iminostilben-verwandte Substanz handelt, kann nicht sicher gesagt werden. Wir bezeichneten diese Fraktion daher als Metabolit VII a. Iminostilben ist so schwach sauer, daß es sich auch im alkalischen Milieu extrahieren läßt. Die Rf-Werte des in Äthanol gelösten Iminostilbens zeigten bei der Papierchromatographie sowohl im alkalischen (N-Butanol, gesättigt mit 5 N Ammoniak nach ALGERI und WALKER) als auch im sauren Laufmittelgemisch (N-Butanol, gesättigt mit 15%iger Ameisensäure nach JATZKEWITZ) Übereinstimmung. Geringe Veränderungen in der Molekülstruktur des Iminostilbens können bei Auftreten von Metabolit VII a auch eine Rolle spielen.

Die im neutralen Extrakt des Harns vom 2.10.1966 auftretende Fraktion (Metabolit IX) ist auf Grund der UV-Absorptionskurve ein dem Iminostilben nahe verwandter Metabolit. Die Rotfärbung dieser Fraktion mit Phenolreagenz und unter Lichteinwirkung läßt auf das Vorhandensein einer freien phenolischen OH-Gruppe schließen. Nach Hydrolyse zeigte sich im

neutralen Extrakt unter diesem Rf-Wert keine Fraktion, dafür aber eine im sauren Extrakt, die auf S. 63 beschrieben ist (Metabolit X). Auffällig ist die intensive Gelbfärbung der nichthydrolysierten Verbindung von Metabolit IX mit EHRlich-Reagenz, wie sie für Harnstoffderivate typisch ist. Das läßt darauf schließen, daß es entsprechend den allgemeinen Eigenschaften der Säureamide zur Bildung von Additionsverbindungen mit dem als schwache Säure wirkenden Iminostilben gekommen ist oder in Anbetracht der Pufferwirkung des Harnstoffs zur Bildung eines 5-Carbamyl-5H-dibenzo [b,f] azepin (Tegretol^R) (Frejaville und Bestel 1967, Theobald und Kurz 1963). Die nach saurer Hydrolyse im sauren Extrakt (evtl. nach Abspaltung des Harnstoffs) neu auftretende Absorption zeigt im UV-Spektrogramm eine immer noch langwelligere Absorption (im sauren Milieu 260 nm, im alkalischen Milieu 264 nm) und etwas niedrigeren Rf-Wert als die Iminostilben-Reinsubstanz, was für eine OH-Gruppe im tricyclischen Ring sprechen kann.

Zwei weitere im neutralen Harnextrakt vom 29.9.1966 (16.00 Uhr) und 5.10.1966 sowie im sauren Extrakt des Harns vom 5.10.1966 auftretende Verbindungen, deren UV-Absorptionskurven vollständig mit Iminostilben übereinstimmten (Metabolit VIII und XI) können infolge des niedrigeren Rf-Wertes nicht als identisch mit Iminostilben angesehen werden. Diese beiden Metaboliten konnten im Harn nach Einnahme therapeutischer Insidonmengen nicht nachgewiesen werden.

Wie weit Iminostilben durch Abbau der am Stickstoff sitzen-

den Seitenkette oder durch Abspaltung derselben entsteht, konnte nicht ermittelt werden. Es ist möglich, daß es unter Abspaltung der Seitenkette zur Bildung eines Hydroxy-Iminostilbens kommt (Schindler 1960). Auch für Tofranil, das durch Oxydation und Demethylierung abgebaut wird, ist eine Abspaltung der Seitenkette für möglich gehalten worden.

Auf jeden Fall zeigten sich bei unseren Versuchen Anhaltspunkte für das Vorhandensein des abgespaltenen Piperazinringes im sauren Extrakt (s. S. 47).

Ob weitere fluoreszierende Fraktionen Stoffwechselprodukte des Insidons sind, kann nicht sicher gesagt werden. Es hat sich gezeigt, daß sich die Fluoreszenzen zum Teil nach einem Tag erst aus den Absorptionen bilden. Diese sich abtrennenden Fluoreszenzen (das gilt besonders für die sich bei der Mehrfachdünn-schichtchromatographie abgetrennten Fluoreszenzen) zeigten ein ziemlich einheitliches UV-Spektrogramm:

im sauren Milieu ein Maximum bei 252 nm und ein weit ausgezogenes bei 295 nm; im alkalischen Milieu fanden sich meist nur angedeutet zwei Maxima bei 247 nm und 258 oder 269 nm (Minimum bei 255 nm) in der aufsteigenden Absorptionskurve. Diese Maxima können ganz fehlen, andererseits aber auch stärker ausgeprägt sein.

Wahrscheinlich handelt es sich dabei um geringgradige Veränderungen der Molekülstruktur. Darauf, daß diese geringen Veränderungen eine bedeutende Verstärkung oder Abschwächung

der für die Anregung und Emission optimalen Frequenzen hervorzurufen vermögen und daß diese Überlegungen gerade auch für Insidon von Bedeutung sind, wies bereits Herrmann (1964) hin. Auch die Zweigipfligkeit der UV-Absorptionskurve des Metaboliten IX aus dem neutralen Harnextrakt kann auf geringe Veränderungen der Molekülstruktur zurückzuführen sein, da das kurzwelligere Maximum im Verhältnis zum Hauptmaximum in verschiedener Stärke ausgeprägt sein kann. Auf die beobachteten und auf S. 29 näher beschriebenen Veränderungen bei Lösung bzw. Elution des Iminostilbens in Acetonitril sei hier noch einmal hingewiesen.

Die strukturellen Beziehungen des Insidons zu den Iminodibenzylen (Tofranil) einerseits und zu den Phenothiazinen andererseits (Perphenazin, Fluphenazin) wurden im Beginn der Arbeit bereits erwähnt (S. 1 u. 6). Wie o,o'-Iminodibenzyl durch Kaliumnitrodisulfonat zu dem p-Chinonimin oxydiert wird (Teuber 1958), so ist auch für das 7-Ringsystem die Bildung von 5-Dibenz (b,f) azepinchinonimin beschrieben worden (s.S. 30). Domenjoz und Theobald (1959) haben die drei Stoffgruppen (Phenothiazin-, Iminodibenzyl- und Iminostilbenderivate) untersucht und eine weitgehende Übereinstimmung ihrer Wirkungskomponenten in quantitativer und qualitativer Hinsicht festgestellt, besonders bezüglich der Beeinflussung vegetativer Effektoren. Bei gleichartigen Seitenketten liegt die Wirkungsintensität in der gleichen Größenordnung.

Die Toxizität des Tofranil liegt höher als die von Insidon. Nach Kuhn (1957) entspricht sie, gemessen an den mittleren Letaldosen bei Maus, Ratte und Kaninchen, größenordnungsmäßig ungefähr derjenigen des Chlörpromazins. Suicide mit Tofranil sind wesentlich häufiger beschrieben worden als mit Insidon (Michon und Mitarbeiter 1959, Im Obersteg und Bäumler 1962, Kergall 1964, Gastang und Mitarbeiter 1964). Eine hohe Organafinität bei niedriger Konzentration im Plasma und ein rascher Metabolismus sind auch bei Tofranil angegeben worden. Der intermediäre Abbau erfolgt hier sowohl durch oxydative Hydroxylierung als auch durch N-Demethylierung, wobei die hydroxylierten Abbauprodukte vornehmlich als Glucuronide ausgeschieden werden (Herrmann, Schindler und Pulver 1959, Schindler 1960, Herrmann und Pulver 1960, Herrmann 1963, Adank und Hammerschmidt 1964, Kuhn 1965). Für Insidon kann hierüber nichts Genaues gesagt werden. Sicher ist beim Insidon die Abspaltung bzw. der Abbau der Seitenkette, möglicherweise unter Erhaltung des Piperazinringes. Wie bereits bemerkt, ist auch für Tofranil die Möglichkeit einer Abspaltung der Seitenkette in Erwägung gezogen worden. Fluphenazin (Omca) und Perphenazin (Decentan) - Phenothiazine mit derselben Seitenkette wie Insidon - zeigen ebenfalls wie Insidon gegenüber Tofranil eine größere therapeutische Breite. Das gilt besonders für Fluphenazin. Es ist daher verständlich, daß über Suicide mit Omca in der Literatur keine Hinweise vorliegen. Ein Suicid mit Perphenazin ist erwähnt worden (Im Obersteg und Bäumler

1962). Über den intermediären Abbau des Perphenazins und Fluphenazins konnten keine Angaben gefunden werden, beim Fluphenazin lediglich ein Hinweis, daß die Trifluormethylgruppe fest am Kern gebunden ist und im Körper nicht abgespalten werden kann.

Der positive Ausfall der Reaktionen nach FORREST auf Phenothiazine und Tofranil im Harn nach Aufnahme größerer Mengen von Insidon, der auf das Vorhandensein von Iminostilben zurückzuführen ist, läßt sich auf Grund der konstitutionellen Beziehungen zwischen den Phenothiazinen und Iminostilbenen erklären, die unter den Begriff der Isosterie fallen (Domenjoz und Theobald 1959). Isostere Moleküle zeigen eine weitgehende Übereinstimmung in ihren physikalischen, physikalisch-chemischen und chemischen Eigenschaften, häufig auch eine weitgehende Identität ihrer pharmakologischen Wirkung. Die molekularen Gebäude der Phenothiazine und Iminostilbene weisen in ihrer räumlichen Konfiguration eine sehr weitgehende Übereinstimmung auf. Der Unterschied der beiden Ringsysteme liegt in der $-\text{CH}=\text{CH}-$ - Gruppierung des Iminostilbens, das an die Stelle des Schwefels im Phenothiazingerüst getreten ist. Domenjoz und Theobald (1959) bezeichnen diese $-\text{CH}=\text{CH}-$ Gruppierung als "Pseudoatom", das eine gleichartige äußere Elektronenschale und damit identische Feldwirkung besitzt wie das Schwefelatom und als sterisch identisch mit dem Schwefelatom aufzufassen ist. Wie in einer Tabelle von Schindler und Blattner (1961) zusammengestellt, zeigen Iminostilben

und das 3,7-Dichloriminostilben mit den entsprechenden Verbindungen der Phenothiazinreihe analoge Schmelzpunkte und Löslichkeiten in Petroläther, Äther und Alkohol, während sich für die entsprechenden Iminodibenzylderivate größere Unterschiede ergaben.

Die quantitative Ermittlung der Insidon-Metaboliten im Harn zeigte bereits zwei Stunden nach Insidonaufnahme meßbare Werte. In den weiteren vier Stunden kam es zu einem schnellen Anstieg der Ausscheidungsprodukte. Das Ausscheidungsmaximum lag bei unseren Untersuchungen am vierten Ausscheidungstag, das tatsächliche Maximum dürfte aber, dem raschen Anstieg am ersten Ausscheidungstag nach zu schließen, zwischen dem 29.9. und 2.10.1966 gelegen sein. Da uns von den Zwischentagen kein Harn zur Verfügung stand, konnte eine lückenlose Verfolgung des Ausscheidungsvorganges nicht vorgenommen werden. Noch am 7. Ausscheidungstag wurden Insidon und seine Metaboliten im Harn nachgewiesen.

Von den von der Patientin als eingenommen angegebenen Medikamenten konnte Barbiturat, Atarax und Insidon nachgewiesen werden. Für die Aufnahme von Librium fanden sich keine Anhaltspunkte. Dafür dürfte die aufgenommene Dosis an Insidon wesentlich höher als angegeben gewesen sein. Sie müßte nach unseren Auswertungen etwa 2 g betragen haben.

XI. Zusammenfassung.

=====

Für die papier- und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen des Stoffwechsels von Insidon stand uns Mageninhalt und Urin nach Insidonaufnahme von drei verschiedenen Tagen zur Verfügung. Das biologische Material wurde nach Aufnahme von 2 g Insidon und 17 Kapseln Vesparax in suicidalen Absicht gewonnen. Die Patientin konnte trotz Ausbildung eines schweren klinischen Bildes, das in der Arbeit beschrieben ist, gerettet werden.

Im Harn wurden die bei tierexperimentellen und nach therapeutischer Dosierung durchgeführten Untersuchungen anderer Autoren gefundenen sieben Stoffwechselprodukte von uns nachgewiesen, wobei sich als Hauptmetabolit eine Fraktion mit sehr niedrigem Rf-Wert im System Kieselgel HF₂₅₄ Merck, Methanol:Chloroform:Essigsäureäthylester = 1:2:1 als Laufmittelgemisch herausstellte. Bei vergleichsweise durchgeführten Untersuchungen nach therapeutischer Dosierung erwies sich diese Fraktion in Startnähe ebenfalls als besonders stark. Sechs dieser Stoffwechselprodukte sind im alkalischen Milieu extrahierbar. Ein weiterer Metabolit ist das Iminostilben. Es läßt sich normalerweise im sauren Milieu extrahieren, erschien bei unseren Untersuchungen aber auch teilweise im alkalischen Milieu. Weiterhin traten an den drei verschiedenen Ausscheidungstagen jeweils nach dem UV-Spektrogramm dem Iminostilben sehr ähnliche bzw. analoge Stoffwechselprodukte mit verschiedenen Rf-

Werten auf, zwei davon im neutralen und eines im sauren Extrakt abtrennbar. Diese drei verschiedenen Metaboliten konnten im Harn nach therapeutischer Dosierung nicht gefunden werden. Hier war lediglich manchmal im neutralen Extrakt unter dem für Iminostilben errechneten Rf-Wert die typische Absorption und Fluoreszenz zu finden, die ein dem Iminostilben entsprechendes UV-Spektrogramm ergab.

Nach erschöpfender Extraktion wurde hydrolysiert. Dabei fand sich im neutralen und alkalischen Extrakt am Start eine sich gegenüber Metabolit I (Hauptmetabolit) mit Dragendorff's Reagenz stärker anfärbende Absorption, der auch eine Zunahme der Konzentration entsprach, während die Konzentration von Metabolit I nach Hydrolyse wesentlich abgenommen hatte. Außerdem trat im sauren Harnextrakt bei einem nur wenig niedrigerem Rf-Wert als Iminostilben ein vor Hydrolyse nicht gefundener Iminostilben-ähnlicher Metabolit auf. Eine sich im neutralen Extrakt mit Phenolreagenz rotfärbende Fraktion konnte nach Hydrolyse nicht mehr gefunden werden. Für Metabolit I ergab sich durch die Hydrolyse eine Konzentrationsabnahme um etwa ein Drittel, für die übrigen Fraktionen eine Zunahme um etwa ein Achtel der vor Hydrolyse ermittelten Werte.

XII. Literaturverzeichnis.

1. Adahk, K. Dünnschichtchromatographische Unter-
Hammerschmidt, W. suchung von Imipramin.
Chimia 18 (11), 361 (1964)
2. Alapin, B. Insidon in the treatment of pseudo-
und Mitarbeiter neurotic reactions and neuroses with
 prevailing depressive and hypochondria-
 tic symptoms.
Neurol.Neurochir.Psychiat. 16, 179 (1966)
3. Alvarez Sánchez, E. Dibenzazepine derivative, G 33040,
 in internal medicine.
Folia Clin.Int. (Barc.) 16, 201 (1966)
4. Angst, J. Insidon als Antidepressivum - Vergleich
 mit Tofranil; Katamnesen.
Nervenarzt 34, 76 (1963)
5. Angst, J. Intoxikationen mit Psychopharmaka.
 Therap. Umschau 22, 178 (1965)
6. Angst, J. Suicid mit Opipramol (Insidon ^R).
Brandenberger, H. Psychopharmacologia 11 (2), 174 (1967)
Herrmann, B.
7. Antônio, E.C. Clinical observations made in the
 climacteric with a dibenzazepine
 derivative.
Rev.Brasil.Med.(Port.) 23, 254 (1966)
8. Artner, J. Use of psychopharmacologic drugs in
 gynecology and obstetrics.
Geburtsh.Frauenheilk. 26, 878 (1966)
9. Azima, H. Effects of G-33040 (Ensidon) and
Silver, A. G-35020 (Pertofrane) on depressive
Arthurs, D. states.
 Canad.Med.Ass.J. 87 (23), 1224 (1962)
10. Azima, H. Effects of G 33040 in depressive
Silver, A. states; a multiblind study.
Arthurs, D. Amer.J.Psychiat. 119 (5), 465 (1962)
11. Baur, G. Mitteilungen zum Thema: Akute In-
 toxikationen mit Psychopharmaka und
 deren Therapie.
 Therap.Umschau 22, 191 (1965)
12. Bergmann, E.D. Überführung von 9-hydroxymethyl-
Rabinovitz, M. acridane in 5-dibenzo (b,f) azepine;
 Reduktionsvorgang.
 J.org.Chemistry 25, 827 (1960)
13. Bichel, M.H. Structure and antidepressant activity
Brodie, B.B. of imipramine analogs.
 Intern.J.Neuropharmacol. 3 (6), 611
 (1964)

14. Bojanovský, J.
und Mitarbeiter Comparison of the effects of
Insidon and Meprobamate on the
K, Cz and Na-ions in blood.
Activ Nerv.Sup.(praha) 8, 439 (1966)
15. Bojanovský, J.
und Mitarbeiter A comparison of the therapeutic
effect of insidon and meprobamate
in neurotic women.
Activ Nerv.Sup.(praha) 8, 440 (1966)
16. Boucaud de, M.
Kerneuzet, P. Effets therapeutiques de l'Insidon
dans les troubles thymiques de l'en-
fant.
Rev.Neuropsychiat.Infant. 11, 335
(1963)
17. Braunhofer, J. Ein Beitrag zur Behandlung psychoso-
matischer Störungen.
Therapiewoche 12, 832 (1962)
18. Breton, J.
Caroff, J.
Dérobert, L. Intoxication mortelle par ingestion
d'opipramol.
Ann.Méd.lég. 44, 265 (1964)
Presse Méd. 72 (27), 1616 (1964)
Dtsch.Zeitschr.für die gesamte
gerichtliche Medizin 56 (4), 379 (1965)
19. Brousolle, B.
Drouet, J.
Reynier, M.
Laborit, H. Pharmacologie du G 33040 psychotrope
adrénolytique.
Revue Agressologie 3, 723 (1962)
20. Brügel, W. Einführung in die Ultrarotspek-
troskopie.
Wissenschaftliche Forschungsberichte,
naturwissenschaftliche Reihe
Band 62 (1962)
21. Büchi, J. Grundlagen der Arzneimittelforschung
und der synthet, Arzneimittel.
(1963)
22. Butenandt, A.
Biekert, E.
Neubert, G. Über Ommochrome. Modellversuch zur
Konstitution der Ommochrome: 5-Dibenz
(b,f) azepinchinonimine als Reaktions-
produkte der 5-Acetyl-Phenoxazone mit
Alkali und als Oxydationsprodukte des
2-Amino-3-hydroxy-aceto-phenons.
Liebigs Ann.Chem. 603, 200 (1957)
23. Castaing, R.
Bourgeois, M.
Chevais, R.
Gillardeau, G.
Faverel-Garrigues,
J.C.
Cardinaud, J.P. Intoxications aiguës par l'imipramine.
Bull. de Méd.Lég. et de Toxicol.Méd.
7, 458 (1964)

24. Chapel, A. L'utilisation du G 33040 dans le traitement des syndromes subjectifs des traumatisés crâniens. Sem.Thérapeutique 30 (10), 651 (1963)
25. Ghulík Orti, F. und Mitarbeiter Treatment of functional syndromes in internal medicine with G 33040. Rev.Clin.Esp. 101, 130 (1966)
26. Craig, P.N. Lester, B.M. Saggiomo, A.J. Kaiser, C. Zirkle, C.L. Analogs of Phenothiazines. I: 5-H-Dibenz (b,f) azepine and Derivatives. A New Isostere of Phenothiazines. J.org.Chemistry 26, 135 (1961)
27. Danhier, A. Contribution a l'étude analytique des dérivés de la Dibenzoazépine, Triméprimine, Imipramine, Desméthyl-imipramine et Opipramol. J.pharm.Belg. 19 (9-10), 385 (1964)
28. Daxelmüller, L. Die psychovegetative Umstimmung mit Insidon in der ambulanten Praxis. Med.Klinik 57, 932 (1962)
29. Dietsch, H. Behandlung des weiblichen Klimakteriums mit Insidon. Med.Welt 1962: 771
30. Dietsch, H. Die Behandlung eines psychovegetativen Überlastungssyndroms in der gynäkologischen Sprechstunde. Therapiewoche 14, 981 (1964)
31. Dietsch, H. Behandlung des vegetativ-dysphorischen Syndroms im Klimakterium. Med.Welt 1965: 119
32. Domenjoz, R. Theobald, W. Zur Pharmakologie des Tofranil^R [N- (3-Dimethylaminopropyl)-imino-dibenzyl-hydrochlorid. Arch.int.pharmacodyn. 120 (3-4), 450 (1959)
33. Donzallaz, E.J. Expérience clinique d'un nouveau produit à indication psycho-végétative l'Insidon en médecine pratique. Praxis 50 (42), 1094 (1961)
34. Drabner, J. Bauer, H. Schwerd, W. Der Nachweis von Opipramol (Insidon^R) und Nortriptylin (Nortrilen^R) im Urin. Arch.Toxikol. 21 (6), 367 (1966)
35. Düggelein, M. Therapeutische Erfahrungen mit Insidon^R in einer internistischen Praxis. Praxis 51, 795 (1962)

36. Dünnet, N. Fatal Insidon and Melleril Case. The Bulletin (International Association of Forensic Toxicologists) 4 (2), (1967)
37. Dureux, J.B.
Duprez, A.
Kissel, P. Treatment of psychoneurovegetative states with an iminostilbene derivative (G 33040, Insidon). Ann.Med.Nancy 3, 1051 (1964)
38. Frejaville, J.P.
Bestel, B. Note sur la toxicité aigue de l'Opipramol. Bull.de Méd.Lég. et de Toxicol.Méd. 10 (5), 37 (1967)
39. Gadret, M.
Bregere, C. Analytical applications of X-ray-diffraction; X-diffraction patterns of phenothiazine derivatives. Bull.Soc.Pharm.Bordeaux 103 (4) 217, (1964)
40. Gnehm, R.
Reich, H.U.
Guyer, P. Analysis of amine mixtures by thinlayer chromatographie. Chimia 19 (12), 585 (1965)
41. Grosser, H.H.
Ryan, E. Drug treatment of Anxiety: A Controlled Study of Opipramol and Chlordiazepoxide. Brit.J.Psychiat. 111, 134 (1965)
42. Gubitz, A. Das psychovegetative Syndrom und seine Behandlung. Therap.Umschau 21, 376 (1964)
43. Hammerl, H.
Pichler, O. Die Beeinflussung vegetativer Funktionen durch 5-(γ -(8-Hydroxy-aethylpiperazino)-propyl)-5-H-dibenzo (b,f) azepin-dihydrochlorid (Opipramol). Arzneim.Forsch. 16 (6), 748 (1966)
44. Hartel, J. Zur Behandlung extragenitaler Krankheiterscheinungen im Klimakterium mit Insidon. Med.Mschr. 17, 163 (1963)
45. Hernández-Peón, R.
und Mitarbeiter Depressant action of insidon on limbic mechanisms regulating autonomic and endocrine functions. Med.Pharmacol.Exp.(Basel) 14, 45 (1966)
46. Herrmann, B.
Schindler, W.
Pulver, R. Papierchromatographischer Nachweis von Stoffwechselprodukten des Tofranil. Med.Exp. 1 (6), 381 (1959)

47. Herrmann, B. Pulver, R. Der Stoffwechsel des Psychopharmakons Tofranil. Arch.int.pharmacodyn. 126, 454 (1960)
48. Herrmann, B. Quantitative Methoden zur Untersuchung des Stoffwechsels von Tofranil. Helv.physiol.pharmacol.Acta 21, 402 (1963)
49. Herrmann, B. Untersuchungen über den Stoffwechsel von 4 [3-(5 H-Dibenzo (b,f) azepin-5-yl)-propyl] -1-(2-hydroxy-äthyl)-piperazin-dihydrochlorid. Arzneim.Forsch. 14 (3), 219 (1964)
50. Hirsch, W. Holtapfel, E. Beitrag zur Therapie psycho-vegetativer Störungen. Med.Welt 1962: 1421 (25)
51. Höhfeld, H.H. Behandlung psychovegetativer Störungen. Ärztl.Praxis 14, 2123 (1962)
52. Hohenauer, L. Akute Intoxikation mit Insidon bei Kindern. Pädiatrische Praxis 5, 95 (1966)
53. Holtz, U. Behandlung von Versagenszuständen und Verstimmungen. Ärztl.Praxis 14, 761 (1962)
54. Holtz, U. Zur Behandlung psychovegetativer Störungen in der inneren Medizin. Therapiewoche 14, 1077 (1964)
55. Huisgen, R. Laschtuvka, E. Bayerlein, F. 2,3; 6,7-Dibenzo-azepin. Chem.Ber. 93, 392 (1960)
56. Johnson, H. Study of Ensidon therapy of neurotic patients in general practice. Lakartidningen 63, 3006 (1966)
57. Junkenitz, K.W. Insidon^R in der Allgemeinpraxis. Dtsch.med.J. 13, 358 (1962)
58. Junkenitz, K.W. Schäffer, S. Ein "kleines Thymoleptikum" aus der Sicht des praktischen Arztes. Med.Welt 49, 2638 (1964)
59. Kaltwasser, F. Therapy of autonomic pain states. Therap.Gegenw. 105, 1601 (1966)
60. Katz, S.E. Nieh, M.T. Thinlayer-chromatographie separation of Riumon and Diuron and some of their known or suspected soil metabolites. Bull.Env.Contam. and Toxicol. 2 (2), 75 (1967)

61. Kergall, C. Etude de 36 cas d'intoxication massives par l'imipramine. Essais de déductions thérapeutiques. Bull.de Méd.Lég.et de Toxicol.Méd. 7, 174 (1964)
62. Kleibel, F. Zur Therapie des Karzinomschmerzes. Münch.med.Wschr. 106, 342 (1964)
63. Konietzko, W. Behandlung funktioneller Organstörungen. Ärztl.Praxis 15, 1054 (1963)
64. Krakowski, A.J. Outpatient treatment of the emotionally ill child: a comparison of two psychotropic agents. Psychosomatics 6, 402 (1965)
65. Krakowski, A.J. Treatment of psychosomatic gastrointestinal reactions in children. Dis.Nerv.Syst. 27, 403 (1966)
66. Kubo, Y. Therapeutic experiences in chronic urticaria. Iryo (Japan) 20, 1192 (1966)
67. Kuhn, R. Über die Behandlung depressiver Zustände mit einem Iminodibenzylderivat (G 22355) Tofranil. Med.Wschr. 87, 1136 (1957)
68. Kuhn, R. Veränderungen der Symptomatik und des Verlaufs der Psychosen durch Medikamente. Phänomenologie und Psychodynamik des therapeutischen Vorganges. Psychopharmacologia 2, 448 (1961)
69. Kuhn, R. Über kindliche Depressionen und ihre Behandlung. Schweiz.Med.Wschr. 93 (2), 86 (1963)
70. Kuhn, R. Untersuchungen über mögliche Zusammenhänge zwischen Metabolitenausscheidung und Krankheitsverlauf depressiver Zustände unter Imipramin-Medikation. Psychopharmacologia 8 (3), 201 (1965)
71. Kunkel, F. Erfahrungen mit Insidon in der allgemeinen Praxis. Hippokrates 34, 36 (1963)
72. Laubichler, W. Indikationsgebiete des Insidon. wien.Med.Wschr. 115 (43), 905 (1965)
73. Lindner, M. Insidon^R in der nervenärztlichen Praxis. Praxis 53, 1261 (1964)
74. Lissandrello, E.C. Insidon in neurovegetative disturbances. Sem.Med. (Buenos Aires) 123 (6), 241 und 258 (1963)

75. Livingstone, H.D. Insidon as a psychoactive agent. Its range of usefulness to the family doctor and the consultant. *New Zeal Med.J.* 65, 182 (1966)
76. Locker, A.
Ellegast, H. Irradiation protection of recent psychotropic drugs. *Experientia* 20 (7), 389 (1964)
77. Locker, A.
und Mitarbeiter The radioprotective effects of psychotropic drugs. *Strahlentherapie* 129, 273 (1966)
78. Lohmüller, W. Neue Behandlungsmöglichkeiten der Reizblase mit einem Psychopharmakon. *Arztl.Praxis* 17, 163 (1965)
79. Mastro, Del, S. Insidon. An automatic and psychio harmonizing agent. *Boll.Chim.Farm.* 102, 85 (1963)
80. Merck, E. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie (Firmenschrift) 1964
81. Michon, P.
und Mitarbeiter Intoxication volontaire mortelle par Imipramine. *Bull.Soc.méd.hôp. (Paris)* 75, 989 (1959)
82. Montserrat, S.
Ballus, G.
Pascual, B.
Prat, J.
Rom, J. Erfahrungen bei der Anwendung des Präparates Insidon (G 33040) in der psychosomatischen Medizin. *Med.Welt* 1963: 1937 (38)
83. Murad, M. Use of a dibenzazepine derivative in cardiovascular disorders of natural function. *Hospital (Rio)* 69, 791 (1966)
84. Im Obersteg, J.
Bäumler, J. Suicid mit dem Psychopharmakon Tofranil. *Arch.Toxicol.* 19, 339 (1962)
85. Fichler, E. Stationäre und ambulante Erfahrungen mit Insidon^R, einem neuen Psychopharmakon. *Wien.Klin.Wschr.* 74, 769 (1962)
86. Pöldinger, W. Klinische Erfahrungen mit dem Iminostilbenderivat G 33040. *Therap.Umschau* 19, 34 (1962)
87. Privat, Y. Trials of prevention by Insidon of psychogenic recurrences of certain dermatoses. *Gaz Med.France* 73, 587 (1966)

88. Racamier, P.C. Un nouveau médicament dérivé de l'imino-stilbène dans le traitement des états dépressifs.
Presse Méd. 70 (54), 2645 (1962)
89. Rajotte, P.
und Mitarbeiter A double-blind comparative study of opipramol and amitriptyline in neurotic and endogenous depressions.
Canad.Psychiat.Ass.J. 11, 159 (1966)
90. Reiter, P.G. Clinical experiences with insidon (Geigy).
Schweiz.Arch.Neurol.Psychiat. 96, 109 (1965)
91. Schäffer, S. Vorläufige Mitteilung über die Anwendung eines neuen psychovegetativen Pharmakons G 33040 in der Ambulanz.
Landarzt 38, 492 (1962)
92. Schindler, W.
Häfliger, F. Über Derivate des Iminodibenzyls.
Helv.Chim.Acta 37, 472 (1954)
93. Schindler, W. Über die Konstitutionsermittlung und Synthese eines Metaboliten von N(-)-[3-(4-Hydroxyethylpiperazino)propyl]-dibenz (b,f) azepine.
Helv.Chim.Acta 43, 35 (1960)
94. Schindler, W.
Blattner, H. Über Derivate des Iminodibenzyls: Iminostilben-Derivate.
Helv.Chim.Acta 44, 753 (1961)
95. Schindler, W. 5- [3-(4-Hydroxyethylpiperazino)propyl] dibenz (b,f) azepine.
Patent: Ger. 1, 133, 729 (1962)
96. Schmid, E. Psychopharmaka: Begriffsbestimmung, Klassifizierung und Wirkungsweise.
Dtsch.Med.J. 16, 119 (1965)
97. Schmid, E.
Tauber, O.
Winter, P.
Heinkel, K. Über die Wirkung von Dibenzoazepin-propyl-hydroxyäthyl-piperazin-hydrochlorid (Opipramol) auf die Magenfunktionen des Menschen.
Z.Gastroenterologie 3, 33 (1965)
98. Schmitt, W.
Meyer, H.H.
Quadbeck, G.
Vogt, J. Die Pharmakotherapie depressiver Psychosen mit einem neuen Iminostilben-Derivat.
Med.klinik 57, 49 (1962)
99. Simpson, G.M.
und Mitarbeiter Opipramol-hydrochloride in the treatment of diseases of the senium.
Bull.Psychopharmacol. 2, 50 (1966)
100. Simpson, G.M.
und Mitarbeiter Opipramol-hydrochloride in the treatment of the senium.
Bull.Psychopharmacol. 2, 63 (1966)

101. Tétreault, L.
und Mitarbeiter Comparative evaluation of the
antidepressive properties of Opipramol,
imipramine and placebo in neurotic
depression.
Un.Med.Canada 25, 546 (1966)
102. Teuber, H.J. Kaliumnitrosodisulfonat als spezi-
fisches Oxydationsmittel in der or-
ganischen Chemie.
Angew.Chemie VB 70, 607 (1958)
103. Theobald, W.
Kurz, H.A. Pharmakologisch-klinische Prüfung
auf Vertreter der Reihe der Imino-
stilbene: 5-Carbamyl-5 H-dibenzo
(b,f) azepin.
Arzneim.Forsch. 13, 122 (1963)
104. Theobald, W.
Buech, O.
Kunz, H.A.
Morpurgo, C.
Stenger, E.G.
Wilhelmi, G. A pharmacological investigation
comparing Tofranil, Pertofran and
Insidon.
Archiv.intern.pharmacodyn. 148 (3-4),
560 (1964)
105. Theobald, W.
Buech, O.
Kunz, H.A. Influence of psychotropic drugs on
autonomic functions in animal
experiments.
Arzneim.Forsch. 15 (2), 117 (1965)
106. Tietzen, A. Therapeutische Erfahrungen mit Insidon
in der nervenärztlichen Praxis.
Med.Welt 1966: 1299 (23)
107. Venecovský, E.
und Mitarbeiter Clinical experiences with the treatment
with Opipramol (ensidone).
Cesk Psychiat. 61, 180 (1965)
108. Vignoli, L.
Cristau, B.
Gouezo, F.
Vassalv, J.M. 1-piperazinethanol 4- [3,5 H-dibenz
(b,f) azepin-5-yl)propyl] -dihydro-
chloride. Thin-layer chromatographie
of some neurotropic medicaments
related to N-substituted Pheno-
thiazine.
Bull.Trav.Soc.Pharm. (Lyon)
2 (3), 277 (1965)
109. Weber, B.
Laborit, H. Toxicité du produit G 33040 psycho-
trope adrénolytique.
Revue Agressologie 3, 731 (1962)
110. Inst.f.Spektro-
chemie u.Angew.
Spektroskopie,
Dortmund;
Photoelectric
Spectrometry
Group, London DMS - UV-Atlas of Organic Compounds.
Verlag Chemie/Butherworths
Vol.III

Herrn Prof.Dr.Dr. Weinig danke ich vielfmals für die
Überlassung des Themas und den Arbeitsplatz in sei-
nem Institut.

Recht herzlicher Dank gebührt Frau Priv.Doziert.Dr.Dr.
Geldmacher- v. Mallinckrodt für ihre zu jeder Zeit
freundlich erteilten Anregungen und Ratschläge.

Weiterhin danke ich Herrn Dipl.Chem. Machbert für
seine Hilfe bei der Auswertung der IR-Spektrogramme.

Lebenslauf

=====

Am 3. April 1929 wurde ich als zweite Tochter des Lehrers Arthur Märsch und seiner Ehefrau Lisbeth geb. Reinsch, in Habendorf Krs. Reichenbach/Schles. geboren. Von 1935 bis 1937 besuchte ich die Volksschulen in Wirrwitz Krs. Breslau, Sacrau Krs. Trebnitz und die Pestalozzi-Schule in Breslau, von 1939 bis 1944 die Viktoria- und die Augusta-Oberschule in Breslau. Durch Kriegshilfsdienst, Flucht aus Breslau bzw. Schlesien und einjährige Fabrikttätigkeit wurde mein Schulbesuch von 1944 bis 1946 unterbrochen. Von 1946 bis 1947 besuchte ich die Jungen-Oberschule in Finsterwalde, von 1947 bis 1949 die damalige Mädchen-Oberrealschule in Erlangen, an der ich im Juni 1949 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend arbeitete ich 1 1/2 Jahre als zahnärztliche Helferin, vom 1.2.1951 bis 15. Juli 1951 als kaufmännische Aushilfskraft bei den Firmen P.Gossen & Co. G.m.b.H. und Siemens-Reiniger-Werke A.G. in Erlangen, vom 16.7.1951 bis 31.10.1960 als Bankangestellte bei der Landeszentralbank in Bayern, Zweiganstalt Nürnberg bzw. Zweigstelle Fürth.

Im Winter-Semester 1960/61 begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin, im Sommer-Semester 1961 zusätzlich mit dem Medizinstudium, legte im Mai 1962 die naturwissenschaftliche ärztliche Vorprüfung, im August 1963 die ärztliche Vorprüfung, im Oktober 1963 die zahnärztliche Vorprüfung und am 27.2.1967 die ärztliche Prüfung ab. Im Sommer-Semester 1967 studierte ich noch ein Semester Zahnmedizin, war dann als Medizinalassistentin am Institut für Gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg tätig.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 852 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 2 29 90
